

modes d'extinction
de la fluorescence
des chromophores utilisés en biochimie
comme sondes
moléculaires

Thèse

PRÉSENTÉE

A

L'UNIVERSITÉ DE PARIS VII

pour obtenir

le grade de docteur ès sciences physiques

par

Jean-Jacques BOURGARIT

SOUTENUE LE 2 MAI 1974 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM

M. GOLDBERG
M. SCHOTT
G. MAYER
F. GARNIER
R. COHEN

PRESIDENT

EXAMINATEURS

INVITE

C N R S

n° AO 10790

modes d' **extinction**
de la **fluorescence**
des chromophores utilisés en **biochimie**
comme **sondes**
moléculaires

Thèse

PRESENTEE

A

L'UNIVERSITE DE PARIS VII

pour obtenir

le grade de docteur ès sciences physiques

par

jean-jacques BOURGARIT

SOUTENUE LE 2 MAI 1974 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM

M. GOLDBERG

PRESIDENT

M. SCHOTT

EXAMINATEURS

G. MAYER

F. GARNIER

INVITE

R. COHEN



"You don't see, Genry, why we perfected
and practice Foretelling ?"

"No-"

"To exhibit the perfect uselessness of
knowing the answer to the wrong question".

P R E F A C E

Il ne m'apparaît pas que l'on puisse pratiquer la recherche scientifique à la façon d'un jeu ; je conviens que l'on puisse prendre plaisir à cette activité, je conviens qu'elle possède son éthique et son code, et que certains enjeux soient l'objet de joutes féroces. Il reste que l'acquisition des connaissances n'est pas un sous-produit de la recherche, et que c'est une affaire sérieuse -je suis tenté de croire : historique-.

Certaines traditions, qui donnaient au monde de la recherche son allure un peu épique, féodale, viennent à disparaître, et il est presque certain que cet "adoubement" qu'est la présentation d'un mémoire de thèse devant un jury d'éminents aînés représente une de ces traditions désuètes. J'ai, pour ma part, lu un tout petit nombre de ces "dissertations" ; la rumeur court qu'en général les membres mêmes du jury n'en prennent pas une connaissance approfondie, et c'est un fait, il est vraiment étonnant de constater combien ces ouvrages vieillissent mal, au contraire des publications scientifiques "sérieuses" qui bien souvent prennent du poids avec l'âge.

On ne rédige une thèse qu'une fois dans sa vie : il est bien sûr peu commode d'atteindre ainsi une sorte de perfection. Au demeurant, le temps consacré à cette entreprise ne cesse de diminuer, si bien qu'il devient présomptueux de vouloir produire un monument, une somme ou mieux un ouvrage digne de faire référence. Je tiens bien à préciser cela ici : je ne me sens en aucune manière, comme cela se dit parfois, le spécialiste mondial de tel ou tel sujet (mettons : la Rhodamine B) et je réprouve la tentation de vouloir produire en quelques dizaines de pages une mise au point de la question. Il me semble au contraire, honnête de prétendre que j'ai fait avancer certaines connaissances, très parcellaires, morcellées, et de désirer fournir les éléments qui doivent permettre à un chercheur de comprendre ce que j'ai fait, de pouvoir le reprendre et le poursuivre.

On me rétorquera que c'est le rôle des publications scientifiques... Il est bien connu, en effet, que le contenu d'une thèse sert de matière à répétition : il faut redire, et redire mieux, c'est-à-dire dans le langage très formalisé des publications, ce que l'on a décrit, délayé, disséqué, etc... dans le mémoire officiel. Il m'est odieux de me plier à cette coutume. Je me propose en conséquence de présenter un texte qui sera bref, et conçu comme une somme de cinq courtes publications, chacune étant rédigée de façon à former un tout, et formant un chapitre. Trois autres chapitres ont été intercalés, qui ne sont pas en l'état actuel "dignes" d'être publiés, mais que je crois utiles à qui voudrait situer le travail dans le contexte actuel d'acquisition des connaissances. J'ai groupé en plusieurs appendices le détail des calculs littéraux, ainsi que certains schémas directeurs qui facilitèrent l'élaboration des raisonnements. Je me propose de soumettre les textes à publication aussitôt qu'ils auront trouvé leur forme définitive.

Je souhaite prévenir l'appréhension du lecteur devant les deux défauts manifestes d'une telle approche : le premier est précisément le morcellement, le manque d'unité. Le second est le manque de perspective. L'un et l'autre ont été partiellement évités par le fait même que, travaillant seul et n'ayant jamais qu'un seul objectif en tête : la cohérence du système sur lequel je fondais mes interprétations, il s'est construit une sorte d'architecture, dont les chapitres sont les éléments imbriqués... Dans une architecture, ce sont bien souvent les zones d'ombres qui créent le relief, et il n'est pas d'usage de s'étendre sur les lacunes de son propre travail, au niveau des publications. C'est donc un aspect qui a été réservé à la conclusion.

L'occasion qui m'est fournie ici n'est pas de rivaliser avec Calliope, mais de présenter un matériel propre à établir un peu de connaissance... et de m'y prendre assez adroitement pour éveiller, ne serait-ce qu'une fois, la curiosité -ce qui, dans la langue barbare, devrait s'appeler le "merchandising" de la recherche.

Garches, Août 1973

INTRODUCTION

Les différents chapitres de cet ouvrage sont tous consacrés à l'examen du comportement en solution d'une petite molécule fluorescente, que nous appellerons "chromophore". Il s'agit essentiellement de la Rhodamine B, quoique certains éléments qui vont être présentés tendent à suggérer que la connaissance acquise sur cette molécule est transposable à un grand nombre d'autres. Afin d'examiner ce comportement, des techniques très simples ont été utilisées, et l'appareillage mis en jeu ne présente pas de sophistication : un fluorimètre et un spectrophotomètre UV, raccordés séparément à des dispositifs permettant de thermostatier les échantillons dont on désire analyser les propriétés photométriques.

Nous dirons que c'est l'évolution de ces propriétés en fonction de la température qui a été la clef de toutes nos déductions. Est-ce à dire que cette évolution était inconnue, ou inattendue ? Non pas. Le chapitre I présente un résumé des connaissances jugées "normales" en la matière. Outre ce résumé, on s'est attaché à présenter la molécule de Rhodamine B, très connue des physico-chimistes dans la mesure où elle sert depuis un demi-siècle d'outil, d'étalon ou de cible pour des mesures sur l'état excité, la construction d'instruments d'optique, la détection et le dosage des sels minéraux, etc...

Les premières conclusions originales seront décrites dans le chapitre II : il s'agit de la mise en évidence d'une deuxième forme colorée, apparemment non fluorescente, de la Rhodamine. Cette forme se tient en équilibre thermodynamique avec la forme fluorescente, et nous parlerons de "tautomérisme R-F".

Au chapitre III, on trouvera que l'iodure de potassium agit comme extinc-teur de fluorescence en suivant non pas le chemin classiquement décrit (c'est-à-dire une action sur l'état excité du chromophore), mais en créant les conditions d'un équilibre avec une troisième forme (Cq) de fluorescence non nulle.

Le chapitre IV complète le chapitre III par la description de l'évolution du système avec la température.

Le chapitre V, qui n'est pas rédigé dans le style conventionnel des publications, pose le problème de la généralisation de ces modèles : il nous a

paru convenable de nous demander si la théorie actuelle d'extinction de la fluorescence, qui suppose l'existence d'un phénomène cinétique opérant sur les niveaux excités des molécules, peut souffrir certaines exceptions.

Le chapitre VI donne une certaine substance aux spéculations du chapitre V : il est montré que l'acide aminé tryptophane, considéré en la circonstance comme un chromophore fluorescent, possède lui aussi une forme tautomère non fluorescente.

Le chapitre VII renferme en substance les mêmes indications sur l'acide aminé tyrosine.

Dans les deux derniers cas, l'extinction de la fluorescence par la température s'explique par un déplacement d'équilibre entre la forme fluorescente et la forme non fluorescente. Ce qui constitue donc une généralisation du modèle R-F. Peut-on concevoir que l'action de l'ion I^- sur ces chromophores soit identique à celle qu'il a sur la Rhodamine ?

La question mérite d'être posée, car cette action a été souvent jusqu'ici prise comme test de l'accessibilité du chromophore (surtout par les biochimistes). Le dernier chapitre reprend ce problème, sous une forme théorique d'abord, en proposant des équations et leurs solutions graphiques, puis sous une forme pratique en montrant qu'on peut exploiter ces solutions dans l'étude de l'interaction de la Rhodamine B avec une macromolécule : la gamma-globuline.

La ligne de progression des connaissances dans laquelle s'inscrit, en huit points, ce travail, est énoncée dans le premier chapitre : il s'agit de l'utilisation des molécules fluorescentes dans l'analyse du comportement des macromolécules biologiques en solution. Nous verrons dans ce chapitre, que les connaissances acquises sur ces "grosses" molécules fluorescentes sont faibles en regard des moyens techniques mis en oeuvre pour leur utilisation en tant que sonde moléculaire. L'ensemble de notre étude accentue cette impression de manque de proportion ; mais notre but n'est pas, ou du moins n'est pas uniquement, de jeter la suspicion sur les conclusions auxquelles sont arrivés jusqu'ici les chercheurs travaillant dans ce domaine : nous nous sommes efforcés de présenter une série d'expériences qui sont toutes très simples, faciles à mettre en oeuvre avec la plupart des chromophores fluorescents, et nous avons montré que les questions que l'on devait se poser sur ces chromophores pouvaient être ainsi tranchées sans délai.

Nous ne nous cachons pas, au demeurant, que ce travail, mené sans préparation, ni outillage perfectionné, aurait pu être poussé beaucoup plus loin dans de meilleures conditions, et que si nous avons pu poser certaines questions, les réponses que nous leur opposons ne sont guère détaillées.

TABLE DES MATIERES

PREFACE	III
Introduction	V
English abstract	IX
 Chapitre I : approche bibliographique	 1
Chapitre II : L'équilibre R-F de la Rhodamine B	23
Chapitre III : L'extinction de la fluorescence par IK	43
Chapitre IV : Rôle de la température dans l'effet IK	59
Chapitre V : Généralités sur la luminescence	77
Chapitre VI : L'équilibre I-F du L-Tryptophane	85
Chapitre VII : Thermochromisme de la L-Tyrosine	94
Chapitre VIII : Effet IK et sondes moléculaires	101
 CONCLUSION	
Appendices	
Index des noms d'auteurs	
Remerciements	

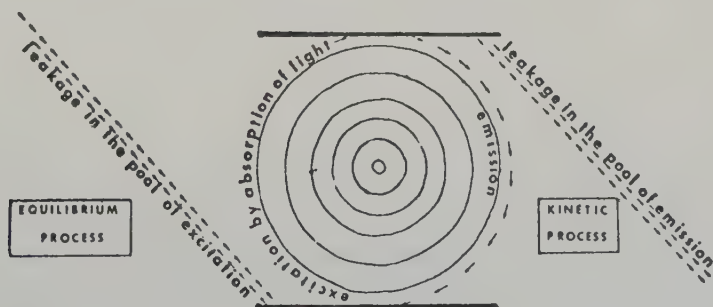
Chap. I Molecular probes are, at least "giant molecules", at worst "unknown molecules" if one refers to amount of scientific knowledge. Rhodamine B is chosen here as a model for further studies on biological samples.

Chap. II It is shown that absorption coefficients, in the visible range, decrease as temperature increases, for 10^{-6} M Rhodamine B in buffered solutions. It is suggested that this is due to an equilibrium displacement between two coloured species. Thermal fluorescence quenching measurements show that this model sustains a possibility that one of this species : R is not fluorescent, while the other has nearly 100% fluorescence quantum yield.

Chap. III Potassium iodide, IK, is a known quencher of fluorescence. It is shown that absorption spectra of Rhodamine B are IK dependant. It is shown, from fluorescence data, that quenching could result from a stoichiometric addition of one IK to one rhodamine, leading to another Weakly fluorescent species. Equilibrium constant is $4,9 \text{ L. M}^{-1}$

Chap. IV Temperature quenching of quenched solutions of Rhodamine leads to a very intricate collection of datas. An "external heavy atom effect" representation is shown to be consistent with those datas. But the perturbation in absorption spectra, and the subsequent isobestic points which are identified sustain the model of chap III : the effect of IK is to introduce new "iodinated" species .

Chap. V See figure : TWO ASPECTS OF FLUORESCENCE QUENCHING



Chap. VI Isobestic points appear in the evolution of absorption spectrum of L-Tryptophan with temperature (5° – 60° C). Good correlation is shown with respect to subsequent quenching of fluorescence measurements. A model of equilibrium between a fluorescent (F) species and a non fluorescent (I) species is therefore conceived. Thermodynamical parameters of such an equilibrium would be $7,5 \text{ kcal. Mole}^{-1}$ for enthalpy, 20 U.E. for entropy.

Chap VII Observations of temperature perturbation in absorption spectra and fluorescence emission of L-Tyrosine solution lead to similar conclusion.

Chap VIII Quenching of fluorescence is a mean of titration for scientists involved in the study of macromolecules. Data are analysed along usual classical schemes – theoretical treatment of non classical schemes such as those which have been illustrated in preceding chapters show that they might be interpreted in a thoroughly different manner. An illustration is given with measurement along the classical (Eisen) way of the interaction of an immunoglobuline (IgGH) with an hapten (Rhodamine B).

CHAPITRE PREMIER

La Rhodamine B est-elle utilisable comme sonde moléculaire ?
une approche bibliographique

RESUME

La connaissance et l'interprétation des propriétés de la rhodamine B résultent essentiellement de données spectrophotométriques. On relève dans ces données des anomalies (évolution du spectre d'absorption avec la température, extinction de la fluorescence par la température sans modification de la durée de vie) des particularités (absences de phosphorescence) et des contradictions (extinction de la fluorescence par l'ion I^-). Dans l'eau, la réactivité chimique semble se limiter à la dimérisation, ainsi qu'à une certaine tensioactivité. A pH neutre et basique, la molécule porte deux charges opposées ; la seule métachromasie recensée est celle qui résulte du changement du nombre de ces charges.

On conclut que la molécule

1°) ne se distingue pas des autres colorants par la nature des problèmes qu'elle soulève,

2°) semble adaptée à l'étude d'interactions avec les interfaces (adsorption) en raison de son comportement dipolaire et tensioactif.

3°) occupe une position centrale tant par la somme des publications dont elle a fait l'objet que par le nombre de ses dérivés et proches parents.

On doit attribuer à Klotz (1) le mérite d'avoir su employer des sondes moléculaires dans l'investigation des propriétés des protéines. Lui et ses collaborateurs utilisent des colorants pour établir des distinctions entre protéines, tracent des corrélations entre charge et affinité (2). Ce travail se perfectionne ensuite par l'acquisition de techniques de fluorescence. Grâce aux sondes moléculaires fluorescentes, on parvient à caractériser certaines interactions, à mettre au point des techniques de mesure des dimensions des protéines. La molécule la plus connue sous cet aspect a été découverte par Weber et al (3) : c'est l'ANS. Il faut lire les articles d'Edelman et al (4) et de Stryer (5) pour réaliser à quel degré de sophistication on est ainsi parvenu. Les techniques de mesures se sont compliquées cependant, et le petit spectrophotomètre de Klotz est devenu un gigantesque instrument permettant de suivre des phénomènes qui se déroulent sur une nanoseconde.

Le point faible de cette technologie avancée reste dans la sonde elle-même. Des molécules aussi complexes que colorants et chromophores fluorescents ne reçoivent pas toute l'attention des chimistes et des physiologistes. Leurs propriétés sont mal connues. De plus, on attend toujours une théorie quantique satisfaisante de la luminescence (6).

Voici donc ce que nous nous proposons de faire : prendre une molécule fluorescente banale, reflétant autant que possible l'ensemble des propriétés des molécules de ce type, et en observer attentivement les propriétés de luminescence. Ce qui nécessite au départ peu de matériel, peu de moyens techniques, et le moins possible d'idées préconçues. Il s'agit de connaître suffisamment le comportement de la molécule lorsqu'elle est seule, dans l'eau, pour savoir interpréter -et détecter- les perturbations de ce comportement résultant de son interaction avec une protéine.

La molécule que nous avons choisie est la Rhodamine B. L'objet de ce chapitre est d'amorcer la connaissance avec elle : qu'a-t-on écrit sur elle ? Peu de colorants (sinon sans doute l'éosine et le bleu de méthylène) ont reçu plus d'attention depuis 70 ans. Il est difficile de prendre connaissance de toute la littérature, difficile aussi de faire ressortir si telle ou telle hypothèse a été émise une fois et aussitôt oubliée, ou encore si telle autre est très répandue quoiqu'inexacte, ou enfin, si tel type d'expérimenta-

tion a été mené simultanément sur d'autres colorants. Nous souhaitons, malgré tout, atteindre deux objectifs : le premier est d'argumenter que la Rhodamine B ne se distingue des autres colorants par aucune singularité essentielle. Le deuxième est d'établir en quoi notre contribution, qui apparaîtra dans les chapitres suivants, est originale tout en étant présente à l'état latent dans certaines observations ; certaines conclusions paraîtront même très proches des nôtres. Nous aborderons dans cette revue quatre grands thèmes :

- L'histoire de la Rhodamine B, ses propriétés chimiques, ses propriétés physico-chimiques, et les propriétés de ses états excités.

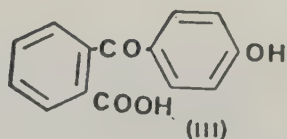
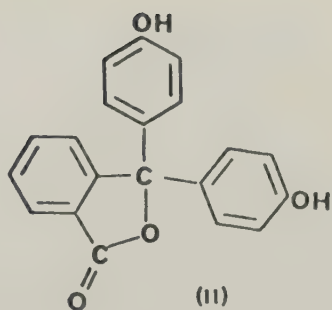
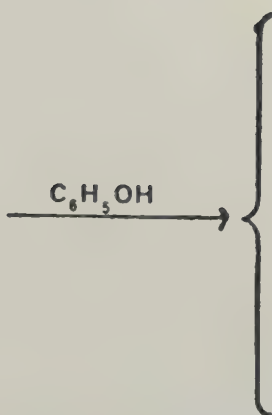
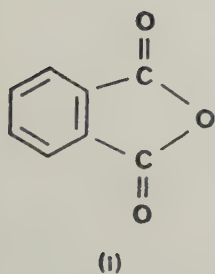
HISTORIQUE

Le nom Rhodamine est couvert par un brevet de la Bad ische Anilin, datant de 1887 ; il apparaît pour la première fois dans la littérature en 1888 (7). On en attribue souvent la paternité à Baeyer : ce grand chimiste attaque en effet le problème des colorants "phtaléines" en 1876 (8), mais il faut attendre 1910 (9) avant qu'il n'aborde l'étude de la Rhodamine.

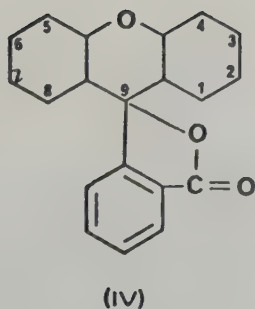
Il est néanmoins indiscutable que le procédé de synthèse (condensation de l'anhydride phtalique sur les phénols en présence d'agents deshydratants) est dû à Baeyer. Pour synthétiser la Rhodamine, on doit utiliser un aminophenol, et le produit obtenu diffère selon la nature du groupement aminé (s'il n'est pas substitué, on obtient la Rhodamine... s'il porte deux groupements éthyl, on obtient la Rhodamine B, etc...). Les diverses Rhodamines ont été aussitôt baptisées, certaines plusieurs fois : un grand nombre d'entre elles sont décrites avant 1900 (10 - 12). La fluorescence de ces produits, ainsi que leur utilisation dans la teinture de la laine, sont connues dès cette époque. Le scientifique qui nous semble aujourd'hui s'être substitué à Baeyer est, en ce qui concerne la Rhodamine, le soviétique I. S. Ioffe.

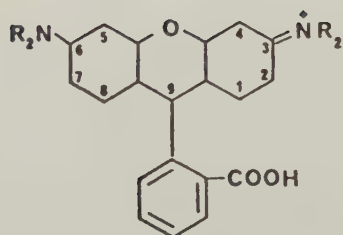
PROPRIETES CHIMIQUES

La condensation des phénols avec les aldéhydes cycliques (I) permet d'obtenir des phtaléines (II) ou des acides aroylbenzoïques (III), et, en chauffant, des fluorans (IV). Les phtaléines ne diffèrent des dérivés du triphenyl méthane que par la présence d'un groupement carboxylique sur un noyau aromatique, en ortho par rapport au carbone central. L'introduc-

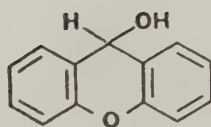


CHALEUR

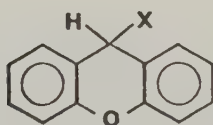




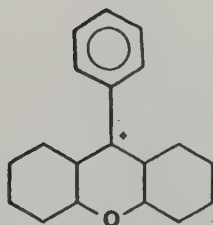
(v)



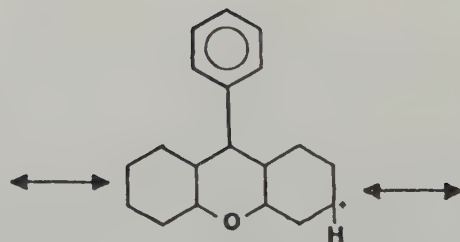
(vi)



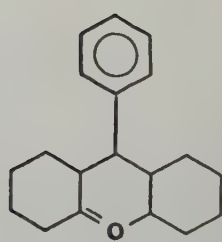
(vii)



(viii)



(ix)



(x)

tion de deux groupements aminés en position 3-6 rend possible la structure quinoïde, qui correspond à une forme colorée (13), alors que la forme lactone (IV) est incolore : les Rhodamines sont donc des dérivés aminés des fluorans (l'effet des groupements OH est le même que celui des groupements NH_2 : on obtient les fluoescéines, qui sont des dérivés hydroxylés des fluorans). On peut donc se représenter, au choix, la molécule de deux façons : comme un dérivé du triphényl méthane dans lequel deux des trois noyaux sont réunis par un pont oxygéné, ou comme un dérivé de l'hétérocycle (VI) où un noyau carboxyphényl a été condensé en ortho sur la position 9. Le composé (VI) est le xanthidrol, hétérocycle dérivé du xanthène (14). De nombreux colorants sont des dérivés du triphényl méthane ; beaucoup aussi sont des hétérocycles. Il semble cependant que les propriétés de la Rhodamine tiennent davantage du xanthène que du triphényl méthane. Nous adopterons donc la deuxième façon.

Plusieurs auteurs (15-17) ont décrit la réactivité chimique de ces hétérocycles. Nous retrouvons les propriétés du xanthidrol (VI) : réactivité du carbone 9 envers les groupements méthyléniques et aminés, les noyaux aromatiques, l'hydrogène sulfuré et l'eau oxygénée, sensibilité à la chaleur, aux agents oxydants, aux acides dilués, avec mention particulière au chlorure et bromure de xanthidrol (VII) qui se comportent comme "halogènes positifs".

Les xanthidrols substitués sont proches des triaryl carbinols, réagissant fortement avec les acides minéraux, les acides organiques et leurs chlorures. On notera qu'avant même l'introduction des groupements aminés, ces molécules se comportent comme une base.

Les sels de xanthylum (VIII, IX, X) se présentent à la façon d'un mélange de formes tautomères : ion carbonium (VIII), ion quinocarbonium (IX), ion oxonium (X), la littérature faisant plutôt état de formes résonnantes. Ils sont hydrolysables par l'eau, les alcools, les alcalis, les substances basiques, mais la stabilité envers l'hydrolyse est accentuée par la présence de substituants en 3, 6, et par le COOH en ortho. La présence d'OH en 3, 6, 1, 8, accroît au contraire la réactivité par rapport aux agents alcyants, halogénants, nitrants. Le carbone 3 réagit avec les métaux et les composés organo-métalliques (les halogènes et les amines aromatiques s'il est déjà substitué). Le carbone 9 peut également se montrer réactif s'il est déjà substitué. L'oxydation conduit à l'ouverture de l'hétérocycle par coupure au niveau du carbone central. La réduction conduit au xanthène.

Si le substituant en 9 est lui-même un xanthène, on obtient le dixanthylène dont les propriétés, notamment le thermochromisme (18) et le phototropisme (19) restent inexplicables.

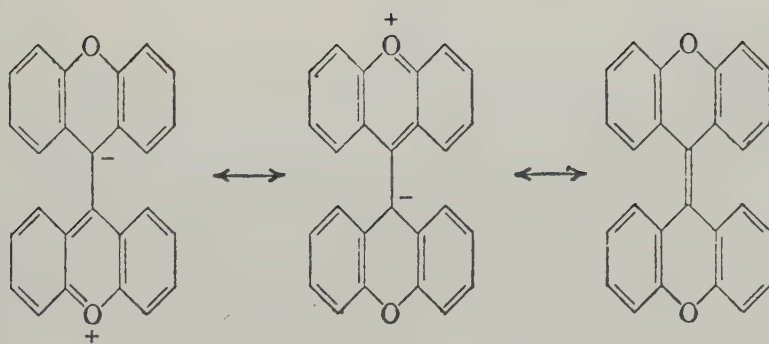
Enfin quelques propriétés se rattachent à la présence du groupement carboxylique en ortho et des substituants en 3, 6 : il s'agit essentiellement de l'équilibre entre formes lactoïde et quinoïde, de l'ouverture du cycle lactone, de la diminution de basicité résultant de la présence de groupement acide. Une mention particulière à la Rhodamine B doit être faite au sujet de l'action des alcali (20) : il semble que la soude réagisse, réversiblement, sur la molécule dans un rapport stoechiométrique double de ce que l'on attend. Mes propres observations me permettent cependant d'avancer que le produit de cette réaction est métastable et détruit par la chaleur ; il conviendra pourtant de ne pas utiliser sans précautions particulières les solutions sodées comme solvant de la Rhodamine B. Quant à l'ammoniaque et ses dérivés (notamment l'aniline, l'hydroxylamine), ils peuvent donner des lactames ; le nitrate d'argent, les sels de mercure, les halogènes donnent, difficilement, des substitutions sur le noyau xanthénique. L'acide acétique estérifie, en présence d'acide sulfurique, les groupements aminés secondaires et donne un produit incolore. La Rhodamine B, dont les deux azotes sont trisubstitués, ne réagit pas de cette façon. L'ester éthylique de la Rhodamine B est la Rhodamine 3B (il s'agit de l'estérification du groupement COOH).

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Nous entendons grouper sous ce titre passe-partout l'examen des propriétés qui sont susceptibles, dans l'eau, d'entraîner l'association réversible d'une molécule de colorant et d'une macromolécule : les propriétés de luminescence seront traitées plus loin. Nous aborderons successivement l'ionisation, l'hydratation et tensioactivité et la dimérisation.

A) Ionisation

La plupart des auteurs décrivent la Rhodamine B comme porteur d'une charge positive, dans l'eau (la fluorescéine étant sensée porter une charge négative) - c'est ainsi que l'on trace le plus souvent la ligne de partage entre les colorants. Il convient plutôt, à notre avis, de distinguer ces mêmes colorants par leurs propriétés basiques ou acides respectivement, car ils sont le plus souvent porteurs d'une charge nulle, à pH neutre, faiblement acide ou alcalin.



DIXANTHYLENE

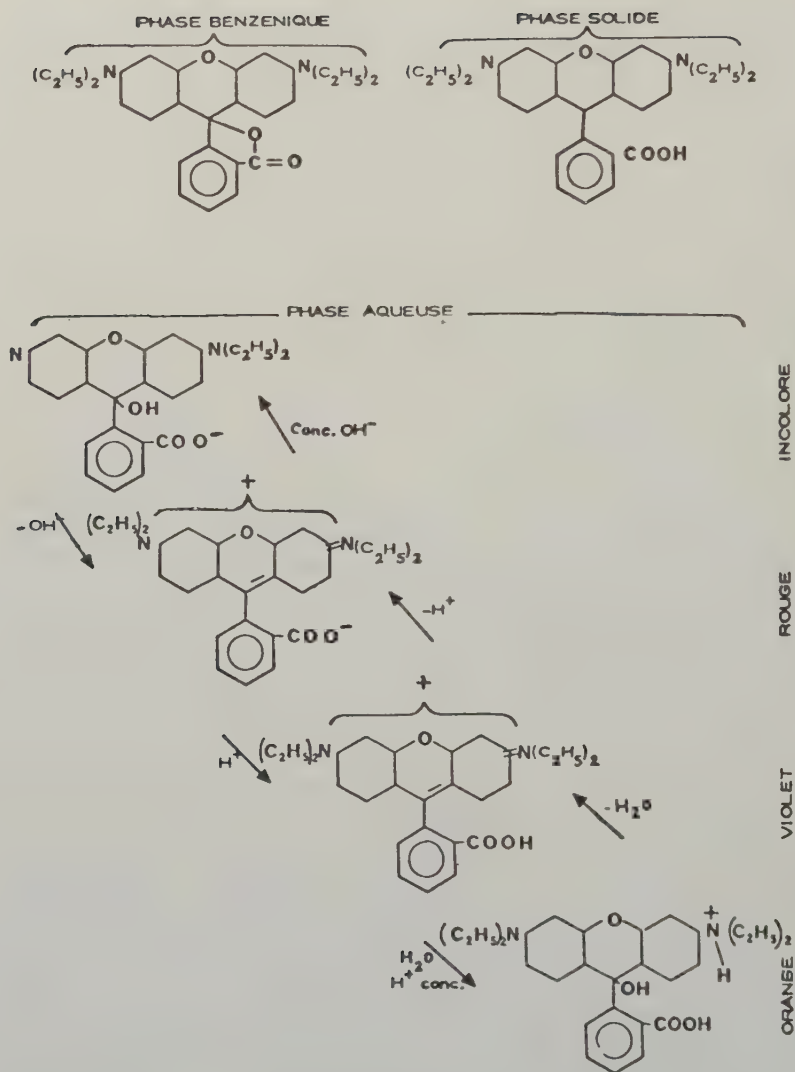


Fig. 3 : Conformations et ionisation de la Rhodamine B dans divers environnements. En phase aqueuse (moitié inférieure de la figure), les divers états du colorant, qui se distinguent par leur coloration, sont présentés dans l'ordre des pH décroissants.

La conductivité à pH neutre est en effet 1080 fois plus faible que celle de NaCl dans les mêmes conditions (21). La constante d'ionisation a été déterminée indépendamment par trois auteurs (22-24) qui trouvent respectivement des pK de 3,2 - 3,7 - 3,4. Tous ces auteurs considèrent que le pK ainsi déterminé est celui du groupement $COOH$.

Cette transition est confirmée par la détermination spectrophotométrique (25). Cependant, une publication ultérieure (26) bouleverse ces interprétations en posant que l'ionisation du groupement $COOH$ ne modifie pas le spectre d'absorption. L'auteur montre que la molécule possède un pouvoir tampon entre pH 7 et pH 10, dans l'eau, à faible concentration ($1,9 \cdot 10^{-5}$), et conclut que le pK_a est de 9. On peut difficilement adopter cette conclusion : le même auteur observe une décoloration de la molécule à pH plus élevé (entre NaOH 1M et NaOH 10M) due vraisemblablement à la fixation d'un OH^- sur le carbone central. N'est-il donc pas possible que, comme toutes les molécules amphotères, la nôtre serve de tampon à des pH intermédiaires entre son pK_a et son pK_b ? Base forte, acide faible, la Rhodamine B atteint vraisemblablement la neutralité électrique à pH 9 (ce qui, comme il se doit, ne correspond à aucune transition spectrophotométrique). Nous avons rassemblé dans la figure 3 l'illustration de ce point de vue : on notera la disparition de la structure quinoïde, qui s'accompagne de changements notables du spectre, aux pH extrêmes (cette figure a été recomposée à partir des réf. (24 et 26).

B) Hydratation & Tensioactivité

D'après Marinesco (21), le nombre de molécules de solvant fixées par une molécule de Rhodamine B dissoute varie avec la température et la nature du solvant, mais dépasse toujours 10. Il est difficile, en raison de la trop forte concentration qu'il a choisie, de le suivre sur ce terrain. Retenons que la molécule gramme occupe à l'état solide un volume de 333 cm^3 et que ce volume passe à 540 - 560 dans l'eau, et dépasse 1000 dans l'alcool isopropylique. Dans un mélange binaire de ces deux solvants, le volume tend à rester voisin de 500, ce qui est interprété comme une sélection de l'environnement. Il n'est pas sûr, pourtant, que l'eau soit préférée à tout environnement : quoiqu'insoluble directement dans CCl_4 , la Rhodamine est aisément extraite de sa solution aqueuse par ce solvant (27). On l'extraît également de l'eau avec de l'azote (28, 29). On peut même se demander si la décoloration obtenue par les ultra-sons, et attribuée à l'effet de cavitation

(30) n'est pas également une extraction par effet de gaz (nous avons observé qu'il suffit de rincer soigneusement les parois du récipient pour récupérer la couleur, après décoloration par agitation ou barbotage de gaz). Enfin, la plupart des détergents (31-33) e.g. le sodium duodécyl sulfate, les Tween, le triton X 100 forment des complexes métachromatiques avec le colorant. Il nous paraît en conséquence, que la Rhodamine B, quoique polaire et soluble dans l'eau, interagit avec les milieux non polaires, d'une façon qui laisse entrevoir l'importance des interfaces : il s'agit vraisemblablement d'une manifestation de tensioactivité. Cet aspect, qui a reçu jusqu'ici peu d'attention, ne devra pas être négligé lorsqu'il s'agira d'interpréter l'interaction du colorant avec des macromolécules biologiques ou des membranes (34, 35).

C) Dimérisation

L'observation des modifications des propriétés lumineuses des colorants en fonction de leur concentration doit beaucoup à Levshin (36). Une étude systématique de la dimérisation des colorants a été menée entre 1928 et 1941, par des auteurs comme Rabinowitch (37), Holmes (38) et Speas (39). La figure 4 illustre le problème : le spectre d'absorption évolue, donnant naissance à un nouveau pic vers 525 nm. Il semble que le produit formé soit peu fluorescent. La constante d'équilibre peut être évaluée à 10^3 M L^{-1} si l'on fait l'hypothèse que le dimère n'absorbe pas, ou très peu, dans la bande principale d'absorption du monomère (fig. 5). Cette hypothèse est confirmée par Rohatgi (40) qui trouve deux bandes d'absorption pour le dimère, et déduit du rapport des coefficients d'extinction de ces deux bandes que l'interaction n'est pas due à une liaison hydrogène. Le même auteur (41) trouve que la dimérisation s'accompagne d'une chute d'enthalpie et d'un gain d'entropie. L'urée (42) déplace l'équilibre dans le sens du monomère. Nous avons observé (non publié) que le mercaptoéthanol agissait de même. On trouve (43) que ce dimère donne un signal RPE à basse température, sous l'effet de la lumière. Le paramagnétisme du complexe excité tend à montrer que l'on a affaire à un complexe de transfert de charge : de tels complexes ont déjà été observés entre colorants et macromolécules (44) dans lesquels les colorants se conduisent en accepteurs d'électrons. La Rhodamine 6G Interagit avec les polyanions (31) en prenant un spectre d'absorption qui ressemble, selon nous, à celui de son dimère. L'ensemble des considérations qui viennent d'être dites sont personnelles ; notre point de vue rejoint celui

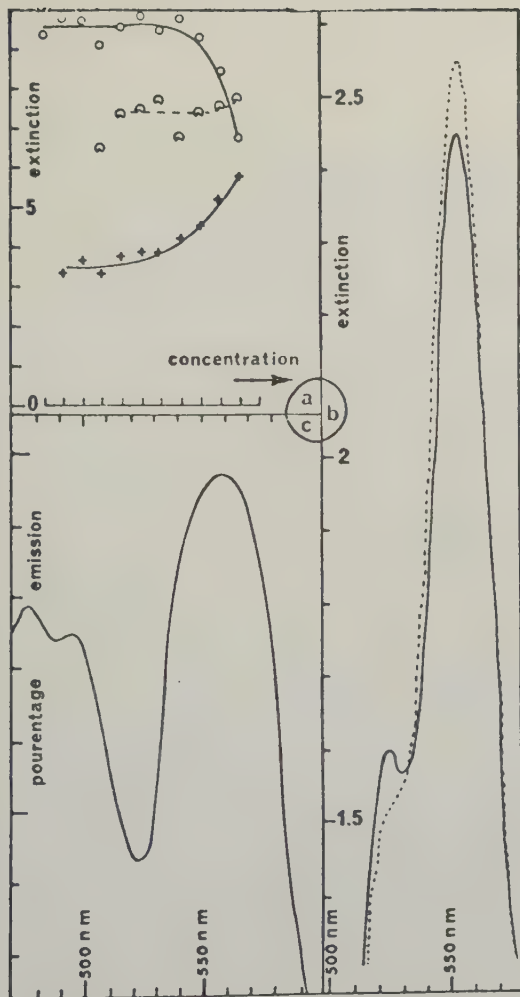


Fig. 4

Apparition d'une nouvelle
forme colorée aux fortes
concentrations :

a) Les abscisses, de droite
à gauche, correspondent à
des dilutions successives
par un facteur deux, faites
à partir d'une solution
 $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ dans NaOH 0, 1M
-La température est 23, 5°C.
-Les ordonnées représentent
les coefficients d'extinction
moléculaire à

(O) = 555nm

(+) = 525nm

(Q) = 355nm

-Instrument : Cary 15

b) Solution $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ dans NaOH 0, 1M. La figure présente le
spectre d'absorption, mesuré en densités optiques (D.O.), sur un
trajet optique de 1 mm. Le spectre en ligne continu a été obtenu
à 30°C, celui en lignes pointillées à 70°C. Instrument : Cary 15.

c) Solution $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ dans NaOH 0, 1M : spectre d'excitation.
Instrument : Cary 17 avec accessoire d'excitation de fluorescence.
Le pic négatif apparaissant à 520-530 nm est attribué à un effet
de filtre interne de l'espèce D (dimère). La cellule de mesure (1 mm
d'épaisseur) n'est pas conçue pour éliminer l'effet de filtre interne :
il n'est donc pas possible de considérer le spectre présenté comme
le vrai spectre d'excitation.

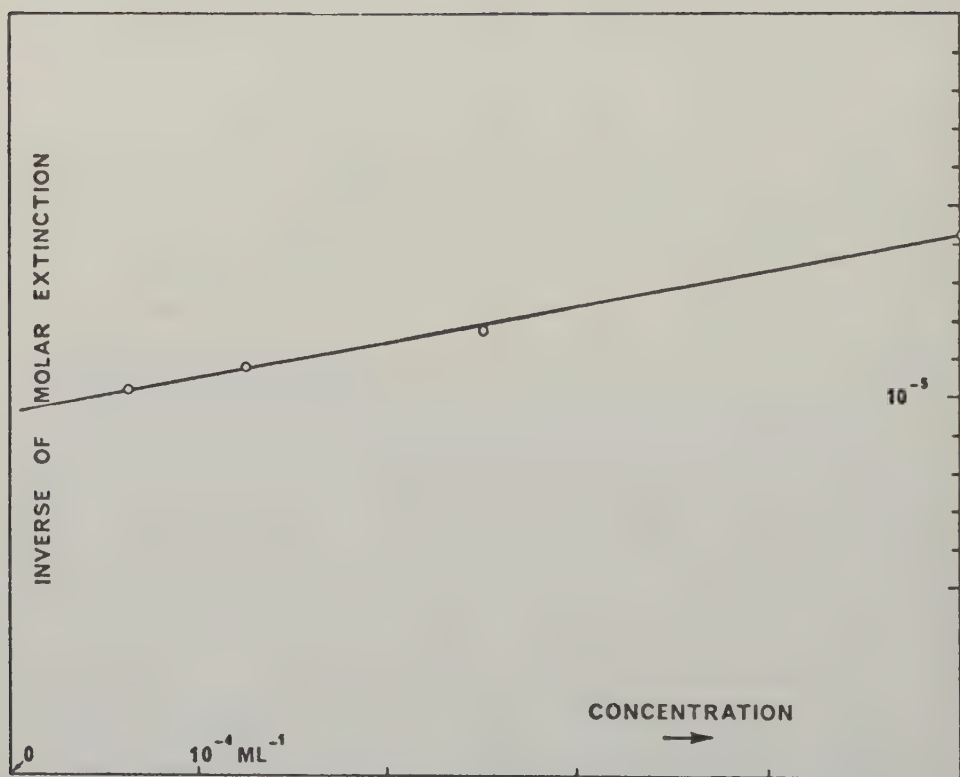


Fig. 5 : En ordonnées, l'inverse des coefficients d'extinction à 555 nm
 En abscisse : la concentration de colorant. La représentation est linéaire, ce qui autorise l'hypothèse que l'espèce D n'absorbe pas à 555 nm, et résulte d'une dimérisation du colorant.

de Szent Gyorgi (45) selon lequel certains colorants devraient être à la fois de bons donneurs, et de bons accepteurs d'électrons. Il semble bien qu'une étude approfondie du mécanisme de dimérisation devrait permettre de comprendre mieux l'interaction du colorant avec d'autres molécules. Nous concluerons provisoirement à la possibilité de trouver des complexes de transfert de charge (46), sans omettre de souligner que ces complexes pourraient n'exister que dans des solutions irradiées... C'est ainsi que Levshin et al (47) semblent pouvoir fabriquer des dimères fluorescents de Rhodamine par irradiation d'extraits incolores. La fluorescence du dimère est un fait qui semble établi, l'émission ayant lieu à 60-100 nm au-delà de l'émission du monomère (48).

La dimérisation, la tensioactivité et l'ionisation ne rangent pas, comme nous le verrons, la Rhodamine dans une catégorie à part. Nous avons confondu par moment les publications traitant de la Rhodamine B, et celles qui concernent d'autres Rhodamines, comme la Rhodamine 3B et la Rhodamine 6G. Rien ne permet en effet, de penser que ces produits, si voisins sur le plan de la structure, doivent différer beaucoup dans leurs propriétés physico-chimiques. Il n'en est plus de même en ce qui concerne les propriétés de leurs états excités.

PROPRIETES DES ETATS EXCITES

Nous aborderons successivement quatre thèmes : absorption, fluorescence, phosphorescence, et transitions non radiatives.

A) Le spectre d'absorption :

Le coefficient d'extinction du principal maximum d'absorption, dans le visible, dépasse 10^5 , ce qui dénote une transition $\Pi^* \leftarrow \Pi$ (49, 50). De nombreuses interprétations théoriques du spectre d'absorption ont été publiées. Nous nous sommes arrêtés à l'explication de Laffitte (51, 52) qui traite les propriétés électroniques comme celles d'un milieu conducteur à 12 électrons répartis sur six doubles liaisons conjuguées (modèle métallique). Il y a une bonne concordance entre le spectre d'absorption et le spectre d'excitation (53), de sorte que toutes les transitions principales doivent être des transitions vers les niveaux singlets. On a pourtant mis récemment en évidence (54) une faible bande d'absorption $T^* \leftarrow S$ (dans le méthanol et le chloroforme). L'aspect le plus curieux du spectre d'absorption de la Rhodamine est qu'il évolue avec la température : Pringsheim le mentionne brièvement (55), mais l'effet a reçu plusieurs confirmations (39, 56, 57). L'idée

a même été introduite (57) que le colorant se tient, dans l'alcool éthylique, en équilibre tautomérique avec une forme qui n'absorberait pas dans le visible : Cette conclusion se trouve en contradiction avec celle de Weber et Teale (58) qui trouvent que le rendement quantique ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation, entre 210 nm et 600 nm (s'il existait une espèce qui absorbe la lumière UV et non la lumière visible, ce procédé l'aurait identifié). Le problème reste donc ouvert, et nous y reviendrons dans un chapitre suivant. Notons, enfin, que le spectre d'absorption évolue selon la nature du solvant (59-62) généralement par déplacement du maximum d'absorption, et évolution du coefficient d'extinction de ce maximum.

B) Propriétés de fluorescence :

Il existe peu de données concordantes sur le rendement quantique de fluorescence de la Rhodamine dans l'eau, hormis le fait mentionné plus haut que ce rendement ne dépend pas de la longueur d'onde. Ce dernier point a été exploité pour faire de ce chromophore un convertisseur de photons (63) ou "quantum counter". Une détermination calorimétrique de rendement énergétique (64) a été faite, mais la question se pose de savoir à quelle concentration ces mesures ont été faites (concentration du dimère ?). Nous pensons que, dans l'eau, le rendement est supérieur à 0,2 et inférieur à 0,6, à l'ambiante. Il est très connu que l'intensité du signal de fluorescence dépend beaucoup de la température (55). Un auteur (56) trouve que le spectre d'émission normalisé évolue aussi. Cette observation devra absolument être confirmée. Nous n'avons pas de tableaux chiffrés donnant l'évolution de la durée de vie avec la température, mais certaines remarques (57) et les mesures de dépolarisation à faible concentration (65) semblent traduire le fait que, dans les solvants organiques entre 0°C et 70°C, cette durée de vie est pratiquement constante. Cette remarque s'étend à d'autres colorants comme la fluorescéine, l'éosine, et il est très étonnant que le fait n'ait pas été relevé jusqu'ici. Il reste qu'à très haute température (au-dessus de 140°C), cette durée de vie décroît. L'extinction de fluorescence est-elle donc un phénomène cinétique, comme on le pense (57) (mais la durée de vie devrait décroître), ou résulte-t-elle d'un déplacement d'équilibre tautomérique ?

C) Phosphorescence :

Les niveaux triplets de cette molécule sont difficiles à peupler, et mal connus (66). Plusieurs auteurs (48, 68) rapportent qu'il est impossible

de détecter un signal de phosphorescence, tant en milieu solide qu'en solution à basse température. Il est donc raisonnable de conclure que la probabilité de transition $T^* \xrightarrow{\gamma} S$ ou $T^* \xrightarrow{\gamma} S^*$ est très faible, à toute température (69).

D) Transitions non radiatives :

Il y a deux sortes de transitions non radiatives : celles pour lesquelles l'énergie du niveau excité est transférée sur une autre molécule, et celles pour lesquelles elle est transférée sur un autre état électronique de la même molécule. La première a été décrite par Förster (qui a précisément utilisé la Rhodamine B dans ses expériences) et porte son nom (70). La deuxième reste l'objet d'un certain nombre de spéculations (6). Elle met en jeu, entre autres, les transitions vers l'état triplet. Nous avons vu que ces transitions sont peu probables pour notre molécule, aussi est-il d'usage d'utiliser des agents extérieurs, les "quencher", pour les accentuer. Le travail de Frank et Vavilov (71) est souvent cité, et s'inscrit dans une ligne théorique décrivant l'extinction de fluorescence comme résultant de collisions entre le quencher (en l'occurrence l'iodure de potassium IK) et le chromophore excité. A la suite des travaux théoriques de Jablonski (72), plusieurs auteurs reprennent les mesures expérimentales, et trouvent des résultats concordants (68, 73). On met l'accent sur l'effet de la viscosité, qui fait décroître la fréquence des collisions, comme on doit s'y attendre. Tout porte donc à croire, y compris le fait que la polarisation de fluorescence augmente avec la concentration de quencher, à un phénomène cinétique, peut-être complexe, affectant le niveau excité. Plusieurs auteurs mettent pourtant en doute cette interprétation, le plus assidu étant Lucatu (74) qui propose la formation d'aggrégats non fluorescents. D'autres auteurs (dont on cite les abstracts) (75, 76) proposent une interaction stoechiométrique entre I^- et le colorant, conduisant à un dérivé non fluorescent. On dispose enfin de données montrant l'importance de la charge du groupement $COOH$, et du degré de substitution des groupements aminés (77). Une très intéressante étude (78, 79, 80) montre également que l'effet de IK s'inverse, lorsque ce sel est très dilué.

Citons, pour terminer, Michael Kasha, dont la stature domine actuellement les études de luminescence des molécules :

" Luminescence as a subject in molecular physics in the recent two decades has passed from a topic in classical physics (when measurements of polarization, decay constants and quantum yields could be considered

from the classical point of view) and from a topic in empirical witchcraft (when rules of luminescence based on chemical structures were derived") to a highly sophisticated topic in the quantum theory of molecular electronic structure and behavior" (81).

Si nous n'avons pas recensé, comme on nous le demandera après lecture de ce texte, de publications de mécanique quantique, c'est parce que, à notre connaissance, il n'y en a pas eu. Comme il a été dit plus haut, les molécules de colorants restent un peu trop "grosses" pour les physiciens. On trouve de rares publications traitant de sujets plus modernes que les durées de vie, la polarisation, le rendement quantique : par exemple, la photolyse (82), la cinétique rapide de relaxation (83), la R.M.N. (84), la photolyse de flash (66), le potentiel d'extraction des électrons (85) et enfin les lasers (pour lesquels la recension bibliographique, abondante, nous semble dépasser le contexte recherché ici). Quant au travail des théoriciens, il se limite à quelques équations sur l'évolution du spectre avec la température (86), à quelques calculs sur la concordance entre spectre d'émission et spectre de radiation thermique (87).

CONCLUSION

Le huitième index collectif des chemical abstracts, qui couvre les cinq années 1967-1971, comporte 316 citations sous la rubrique Rhodamine B et ses dérivés. Parmi elles, environ 44 traitent des propriétés optiques et luminescentes, 8 de l'adsorption, 9 de l'activité en tant que sonde biologique, 7 de l'aggrégation & dimérisation, 27 des lasers, 14 de la photo conductivité et photosensibilisation, 6 de l'aspect théorique (identification des niveaux excités).

On trouve, dans le même volume, sous la rubrique générale "colorants" :

- 85 références à la spectrophotométrie,
- 55 références à l'adsorption,
- 76 références à l'activité en tant que sonde biologique,
- 14 références à l'aggrégation et dimérisation,
- 106 références aux lasers,
- 30 références à la photoconductivité et photosensibilisation,
- 15 références à la distribution des états excités,
- 10 références à l'effet des agents tensioactifs.

(La Rhodamine est citée 16 fois, la thiazine 14, les triarylmethyl 24, et la fluorescéine 11 fois).

La comparaison montre que, par rapport à l'ensemble des colorants, on s'intéresse moins à la Rhodamine B en tant que sonde biologique que comme composant de laser. Elle fait aussi apparaître que les colorants restent en marge de l'activité de recherche fondamentale : il y a peu de théorie. On trouve là des substances essentiellement destinées à colorer (textiles, aliments, cheveux) comme le montre la rubrique très complète (635 références) décrivant la synthèse de nouveaux produits

Il faut également mettre l'accent sur l'énorme diversité des journaux dans lesquels sortent ces publications (on en aura un échantillon en consultant la présente bibliographie). La poursuite au jour le jour d'une mise au point bibliographique est une tâche ingrate, et l'on comprend que beaucoup d'auteurs s'ignorent mutuellement (il est paru dans les derniers mois, un nombre non négligeable de publications sur la dimérisation, l'équilibre lactone-quinone, etc. . . qui n'apportent absolument rien à ce qui était déjà connu). Le présent auteur n'a d'ailleurs pas totalement échappé à cette "méconnaissance des connaissances" . . .

La mise au point qui vient d'être présentée présente donc quelque intérêt, outre celui de faire ressortir, ainsi que nous l'avions annoncé, combien notre molécule est un colorant "banal". Le lecteur aura noté les points sur lesquels un travail supplémentaire devra être fourni : dimérisation, activité de surface, évolution du spectre avec la température, effet de IK. Dans les chapitres qui suivent, nous allons nous attaquer aux deux derniers de ces problèmes.

- 1) I. V. KLOTZ : chem. rev. 41, 373 (1947)
- 2) I. V. KLOTZ & J. AYERS : J. am. Chem. soc. 74, 6178 (1952)
I. V. KLOTZ & R. K. BURKLAND & J. M. URQUHART : id p 202
I. V. KLOTZ, GELEWITZ & J. M. URQUHART : id p 209
- 3) G. WEBER & D. J. R. LAURENCE : Biochem. J. 56, 31P (1954)
- 4) S. M. EDELMAN & McLURE : Accounts of chemical research 1 65-70 (1968)
- 5) L. STRYER : Science, 162, 526 (1968)
- 6) E. W. SCHLAG, S. SCHNEIDER & S. F. RISCHER : Ann. rev. Phys. Chem. 22, 456-526 (1971)
- 7) U. SACHSE : Ber. D. D. Chem. Ges. 21 R 682 (1888)
- 8) BAEYER : Annalen der Chemie, 183, 1 (1876)
- 9) BAEYER : Annalen der Chemie, 372, 80 (1910)
- 10) BERNTHSEN : Chemiker Zeitung, 16, 1956 (1892)
- 11) R. MEYER & W. SUNDMACHER : Ber. 32, 2112 (1899)
- 12) PIUTTI : Ber. 31, 1327 (1898)
- 13) E. NOELTING & K. DZIEWONSKI : Ber. 38, 3516 (1905)
- 14) E. NOELTING & K. DZIEWONSKI : Ber. 39, 2744 (1906)
S. WAWZONEK : "Xanthone, xanthenes, xanthidrols and xanthylum salts"
in "Heterocyclic compounds" vol. II, p. 419 R. C. ELDERFIELD ed.
Wiley (N. Y.) (1951)
- 15) P. KARRER : pp 441-541 de "Traité de chimie organique" (V. Grignard et al ed)
vol. 18 Masson Paris (1945)
- 16) H. WAHL : id. Vol. 22, p. 205
- 17) S. WAWZONEK : cf. réf. 14, pp. 501-532 "Fluorans, fluoresceins and Rhodamines"
- 18) SCHONBER, ISMAIL & ASKER : J. Chem. Soc. 442 (1946)
- 19) J. R. HUBER, V. WILD & H. H. GUNTARD : Helvetica Chimica Acta 50, 589 (1967)
- 20) W. R. BROWN & F. A. MASON : J. Chem. Soc. 1933, 1264
- 21) M. S. MARINESCO : J. Chimie Physique, 24, 594 (1927)
- 22) F. E. RAY & M. L. JUNG : Brit. J. Cancer, 5, 358 (1951)
- 23) S. WOISLAWSKI : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 390 (1952)
- 24) R. W. RAMETTE & E. B. SANDELL : J. Am. Chem. Soc. 78, 4872 (1956)
- 25) S. WOISLAWSKI : J. Am. Chem. Soc. 75, 5201 (1953)
- 26) A. GUTSZE & H. WALERYS : Acta Physica Polonica, 23, 581 (1963)
- 27) M. V. SAVOST'YANOVA : Uspekhi khimii 32, 1233 (1963)
- 28) A. B. CARAGAY & B. L. KARGER : Analytical Chemistry 38, 652 (1966)
- 29) B. L. KARGER & A. B. CARAGAY & S. B. LEE : "Separation techniques in chemistry
and biochemistry"

- 30) S. PRAKASH & S. PRAKASH : Zeit fur Phys. Chem. 221, 145 (1962)
- 31) L. V. LEVSHIN, T. D. SLAVNOVA & I. V. PENOVA : Bulletin of the Acad. of Science of USSR, 34, 527 (1970)
- 32) C. R. SINGLETERRY & L. A. WEIBERG : J. Am. Chem. Soc. 73, 4574 (1951)
- 33) A. WATANABE, H. TAMAI, M. MATSUMOTO & R. GOTOH : Nippon Kagaku Zasshi 1969, 738
- 34) S. P. VERMA : Biophysik, 1971, 228
- 35) H. M. ENRICH, W. JUNGE, H. T. WITT : Naturwis, 1969, 514
- 36) V. L. LEVSHIN : Z. f; Physik, 23, 274 (1924)
- 37) E. RABINOWITCH & L. F. EPSTEIN : J. Am. Chem. Soc. 69, 63 (1941)
- 38) W. C. HOLMES : Ind. and eng. Chemistry, 16, 35 (1924)
- 39) W. E. SPEAS : Phys. Rev. 31, 569 (1928)
- 40) K. K. ROHATGI : J. Mol. Spectrosc. 1968, 545
- 41) K. K. ROHATGI & G. S. SINGHAL : J. Phys. Chem. 70, 1695 (1966)
- 42) K. K. ROHATGI & G. S. SINGHAL : J. Phys. Chem. 67, 2844 (1963)
- 43) Yu. V. GLAZKOV, N. I. ZOTOV & E. K. KRUGKIK : Bull. Ac. Sc. USSR, Phys. series : 32, 1388 (1968)
- 44) E. A. BALAZS, G. O. PHILLIPS & M. D. YOUNG : B. B. A. 141, 382 (1967)
- 45) A. SZENT GYORGI : Introduction to submolecular Biology, Ac. Press (N. Y. and London) 1960
- 46) KORSUNOVSKII G. A. & KI. L. ARVAN : Mol. Fotonika, 1970, 264
- 47) L. V. LEVSHIN & N. NIZANOV : Bull. Ac. Sci. USSR, 34, 523 (1970)
- 48) Yu. V. MOROZOV : Biofizika, 8, 331 (1963)
- 49) J. R. PLATT : J. Optical soc. Am. 43, 252 (1953)
- 50) V. I. PERMOGOROV, L. A. SERDYUKOVA & M. D. FRANK-KAMENETSKI : Bull Ac. Sci. USSR 32, 1447 (1968)
- 51) E. LAFFITTE : Ann. Phys. 10, 71 (1955)
- 52) B. S. NEPORENT, N. G. BAKSHIEV & Yu. T. MAZURENKO in "Elementary Photoprocesses in molecules" B. S. NEPORENT ed Consultant Bureau N. Y. (1965) p. 61
- 53) C. W. SILL : Analytical Chemistry, 33, 1579 (1961)
- 54) G. NOUCHI : C. R. Ac. Sci. (AB) 266B, 923 (1968)
- 55) P. PRINGSHEIM "Fluorescence and Phosphorescence" Wiley & Sons (1949) p. 319
- 56) L. SZALAY & L. KOSMA : Acta Physica Hungaria, 20, 389 (1966)
- 57) A. V. ARISTOV, E. N. VIKTOROVA : Bull. Ac. Sci. USSR 34, 645 (1970)
- 58) G. WEBER & F. W. TEALE : Trans. Far. Soc. 54, 640 (1958)
- 59) G. BRAUN : J. Chim. Phys. 33, 559 (1936)

- 60) A. KAWSKI, B. POLACKA & P. CZYS : Acta Physi. Polon. 23, 705 (1964)
- 61) IMAI HIROMA : Technol. Rep. Kansai. Univ. 1967, 49
- 62) E. HEINZ : J. de phys. 15, 219 (1954)
- 63) J. YGYERABIDE : Rev. Sci. Inst. 39, 1048 (1968)
- 64) M. N. ALENTSEV : Zhur. Exp. Theor. 21, 133 (1951)
cité par WEBER & TEALE : Trans. Far. Soc. 53, 646 (1957)
- 65) P. P. FEOFILOV & B. Ya. SVESHNIKOV : J. Exptl. Theor. Phys. 10, 1372 (1940)
- 66) A. K. CHIBISOV, H. A. KEGLE, L. V. LEVSHIN, T. D. SLAVNOVA : J. C. S.
Chem. Comm. 1972, 1292
- 67) A. V. BUETTNER, B. B. SNAVELY & O. G. PETERSON : in "Molecular luminescence" E. C. LIM, Ed. Benjamin (1969) pp. 403-422
- 68) J. GLOWACKI : Acta Physica Polonica, 19, 513 (1960)
- 69) A. V. ARISTOV, S. POLYAKOV : Zh. Prikl. Spektrosk, 1973, 339 (CA 78 146951)
- 70) FORSTER : Z. Naturforsch 4a, 321 (1949)
- 71) J. M. FRANK & S. J. VAVILOV : ZS. f. Phys. 69, 100 (1931)
- 72) A. JABLONSKI : Acta Physica Polonica, 13, 175 (1954)
- 73) J. HEVESI : in "Molecular luminescence", réf. 67, pp. 167-183
- 74) E. LUCATU : J. Chim. Phys. 59, 128 (1962)
" " 60, 92 (1963)
" " 63, 815 et 819 (1966)
- 75) A. K. BABKO, A. P. KOSTYSHIMA : Ukr. Khim. Zh. 1969, 544 (CA 71 44126)
- 76) N. K. PODBEREZSKAYA, V. A. SUSHKOVA, E. A. SHILENKOV :
Issled. Obl. Khim. Fiz. Metodov anal. Miner. syr'ya, 1971, 87 (CA 78 79383)
- 77) J. GLOWACKI : Acta Physica Polonica, 27, 527 (1965)
- 78) W. PRUTZ & E. J. LAND : Biophysik, 3, 349 (1967)
- 79) W. PRUTZ & K. SOMMERMEYER : Biophysik, 4, 48 (1967)
- 80) W. PRUTZ, K. SOMMERMEYER & E. J. LAND : Nature, 212, 1044 (1966)
- 81) M. KASHA : in "fluorescence" G. G. GUILBAULT ed : M. Dekker NY (1967) p. 20
- 82) J. WEBER : Opt. Commun. 7, 420 (1973)
- 83) M. M. WONG, R. A. HECKMANS & Z. A. SCHELLY : J. Phys. Chem. 77, 1317 (1973)
- 84) R. W. HOROBIN & L. B. MURGATROYD : Stain technol, 1969, 297
- 85) B. L. KURBATOV & F. J. VILESOV : Sov. Phys. Doklady, 6, 1091 (1962)
- 86) J. HEVESI & L. KOZMA : Acta Phys. Hungar. 20, 351 (1966)
- 87) J. KETSKEMETY & L. SALAI : Bull. Ac. Sci. USSR 34, 468 (1970)

CHAPITRE DEUX

Mise en évidence spectrophotométrique de la présence d'une espèce non fluorescente dans les solutions aqueuses diluées de Rhodamine B ^{*†}

RESUME

On montre que la décroissance thermique du coefficient d'absorption de la Rhodamine B, dans le visible, correspond dans l'eau au déplacement d'un équilibre entre deux formes colorées. Trois points isobestiques sont mis en évidence, à 520, 534 et 566. Une bonne corrélation existe entre les paramètres de cet équilibre et ceux de l'extinction thermique de la fluorescence. On propose donc qu'une des deux formes : R n'est pas fluorescente, et l'autre : F fluoresce avec un rendement quantique proche de l'unité. L'équilibre R-F n'est pas déplacé par la dilution, le pH, la concentration de gaz dissous. Il est caractérisé par un $\Delta H = 8,2$ kcal/mole, $\Delta S = 21$ u. e. La même interprétation est proposée pour les solutions dans le glycérol. L'examen du thermochromisme dans différents solvants conduit à proposer que F et R diffèrent entre eux et de la forme lactoïde par le degré de solvation.

* Résultats présentés à Menton, au 1er congrès de chimie quantique (Juillet 1973)

† Voir appendices B, C, E, G.

INTRODUCTION

Nous tenterons d'expliquer ici le thermochromisme des solutions diluées de Rhodamine B. On observe, dans un grand nombre de solvants dont l'eau et l'alcool éthylique, une décroissance du principal pic d'absorption de ce colorant lorsque la température augmente, comme l'a décrit, le premier, Speas (1). On a proposé récemment (2) que, dans l'alcool éthylique, cette déformation était due à l'existence d'une forme incolore du colorant, en équilibre avec la forme colorée, et dont la concentration varie avec la température. Cette proposition est appuyée sur le fait qu'aux températures ordinaires, ni le rendement quantique de fluorescence, ni la durée de vie ne varient cependant que le spectre évolue, alors qu'aux hautes températures (140 à 180°C), le rapport du rendement quantique à la durée de vie reste constant. Le problème se pose différemment dans l'eau où, comme l'ont montré Weber et Teale (3), l'existence d'une forme tautomère possédant un spectre d'absorption différent du spectre mesuré ($\lambda > 210\text{nm}$) n'est pas révélée par l'étude du spectre d'excitation. Il reste que la précision des mesures de spectres d'excitation n'aurait pas permis à ces auteurs de déceler l'existence d'une espèce non fluorescente dont le spectre d'absorption diffère peu de celui de la substance fluorescente.

Une théorie générale de la déformation du spectre d'absorption des colorants par effet de température a été élaborée par Hevesi et Kozma (4), qui font appel à une différence de distribution des états vibrationnels dans les niveaux excités et les niveaux de base. Une des conséquences expérimentales de cette théorie, dont nous verrons qu'elle est loin d'être confirmée, est que la durée de vie doit décroître plus vite que le rendement quantique, lorsque la température s'élève. Dans le glycérol, la déformation du spectre d'absorption est très faible aux températures ordinaires. On observe que la durée de vie est pratiquement constante (5), cependant que le rendement quantique de fluorescence : Φ décroît avec la température, selon une loi en :

$$(1) \quad 1 - \frac{1}{\Phi} = k_0 \exp - \frac{\Delta W}{k T}$$

où le terme de droite est le développement classique d'une constante cinétique (ou d'une constante d'équilibre) selon la loi d'Arrhénius. L'existence d'une forme colorée et non fluorescente peut donc être, là encore, envisagée. Les questions que l'on doit donc se poser sont les suivantes :

1°) Peut-on mettre en évidence un équilibre entre deux formes, que

nous appellerons R et F, possédant des spectres d'absorption voisins ?

2°) Est-ce que l'évolution de cet équilibre avec la température peut rendre compte à lui seul de l'évolution du rendement quantique de fluorescence avec la température ?

Il conviendra de ne pas négliger, dans la détermination et l'interprétation des résultats expérimentaux, les nombreux cas recensés d'équilibre de la Rhodamine B qui sont :

- a) la dimérisation (7 - 10)
- b) l'équilibre lactone-quinone (11 - 13)
- c) les divers états ionisés (12, 14, - 17)

Il semble que ce dernier problème, qui est l'objet de quelques contestations (18) lorsqu'il s'agit de solutions alcooliques, soit assez bien délimité en ce qui concerne les solutions aqueuses, auxquelles nous réserverons l'essentiel de notre attention.

MATERIEL ET METHODES

- Tous les solvants : méthanol (Carlo Erba), Glycérol (Merck), chloroforme (M C & B), n undecyl alcool (K & K), acide acétique (Prolabo), eau deutérée (Merck) ont été utilisés sans autre purification, hormis l'eau, distillée sur pyrex à partir d'eau déionisée.

- La Rhodamine B (Baker) est recristallisée (ordinairement deux fois) à partir de sa solution aqueuse jusqu'à ce que le spectre d'absorption UV soit stable. Le point de fusion de la poudre ainsi traitée est de 165-166, comme il se doit, et le coefficient d'extinction moléculaire, au maximum d'absorption, à 23°C, correspond à celui qui est attendu (voir figure 1).

- La préparation d'une solution de colorant dans un solvant autre que l'eau est conduite de la façon suivante : on dépose 100 μ l d'une solution 10^{-3} dans l'eau dans le tube à essai, et la goutte est évaporée. Le solvant frais est versé dans le tube qui est vigoureusement agité.

- Les solutions, pour des raisons qui seront spécifiées dans le texte, ne sont pas habituellement désoxygénées.

- Les mesures de fluorescence sont faites à l'aide d'un fluorimètre Beckman couplé à un enregistreur. Le compartiment de référence de cet appareil (19) qui fonctionne en double faisceau est occupé par un échantillon se présentant sous la forme d'un barreau de résine polyester colorée à l'aide

de la Rhodamine B. Nous avons observé que ce genre de barreau émet un signal de fluorescence dont le spectre et l'intensité sont pratiquement constants dans la gamme de température 0-100°, et c'est avec eux que nous calibrons le signal provenant de l'échantillon (voir détail de la préparation en appendice H).

- Les cellules de mesure sont cylindriques. Dans tous les cas où la densité optique le permet ($D.O \leq 0,1$), des cellules de pyrex de diamètre intérieur 10 mm ont été utilisées. Toutes les cellules de mesure sont lavées à la potasse alcoolique, rincées à l'eau distillée, puis séchées à l'air sec.

-Le filtre d'excitation sélectionne la raie 546 du mercure, le filtre d'émission (Schott OG 590), d'épaisseur 6mm, possède une densité optique 1 à 566nm, et inférieure à 0,5 à 585 nm.

-Les températures sont déterminées par thermocouple. Ce dernier est plongé dans la solution échantillonnée une fois que l'équilibre thermique est atteint (soit, le plus souvent, 20 à 40 minutes après l'insertion de la cellule de mesure dans le compartiment thermostaté). En raison de la formation probable d'un gradient de température dans le tube, il y a une incertitude de $\pm 0,25^\circ$ sur la température.

RESULTATS

Aux longueurs d'onde visibles, le maximum d'absorption de la Rhodamine B varie selon le solvant utilisé : 555 nm pour l'eau, 548 nm pour le méthanol, 562 nm pour le chloroforme, 566 nm pour le glycérol, 552 nm pour l'eau deutérée, 556 nm pour l'acide acétique, 546 nm pour le n undécanol.

La figure 1 montre l'évolution des coefficients d'extinction moléculaire correspondant à ces maximums, estimés à partir d'observation de solution $10^{-6}M$, en fonction de la température. Il n'a pas été tenu compte des perturbations (dilatation thermique, modification de l'indice de réfraction) introduites par le solvant—l'effet provenant de ces perturbations est dix fois plus faible que celui qui est observé. Dans la limite de résolution de notre instrument, le spectre d'absorption ne subit pas de "shift" lorsque la température varie. La table I présente l'évolution de l'intensité de fluorescence avec la température. Les solvants sont respectivement l'eau, tamponnée à pH 9,2 (Borate 0,01M), et le glycérol. Nous avons joint à nos résultats, exprimés en unités arbitraires $\varphi(T)$ ceux de Pringsheim(6), donnés en unités de rendement quantique $\Phi(T)$. Il est peu probable que ces derniers résultats aient été corrigés pour l'absorption (qui varie), car l'auteur affirme le contraire.

SOLVANT :	température en °C	16	20	30	35	40	55	60	70	75	85
GLYCEROL :	$\Phi(T)$	75	70	64	60	55	44	40	32	28	25
SOLVANT :	température en °C	15,2	22	27,3	34,2	42,5	54,9	57	60,3		
EAU :	$\varphi(T)$	6	5,22	4,67	3,58	2,87	2,0	1,86	1,83		

TABLEAU 1

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'INTENSITE D'EMISSION DE FLUORESCENCE
(les résultats se rapportant au glycérol sont ceux de P. Pringsheim réf. 11)

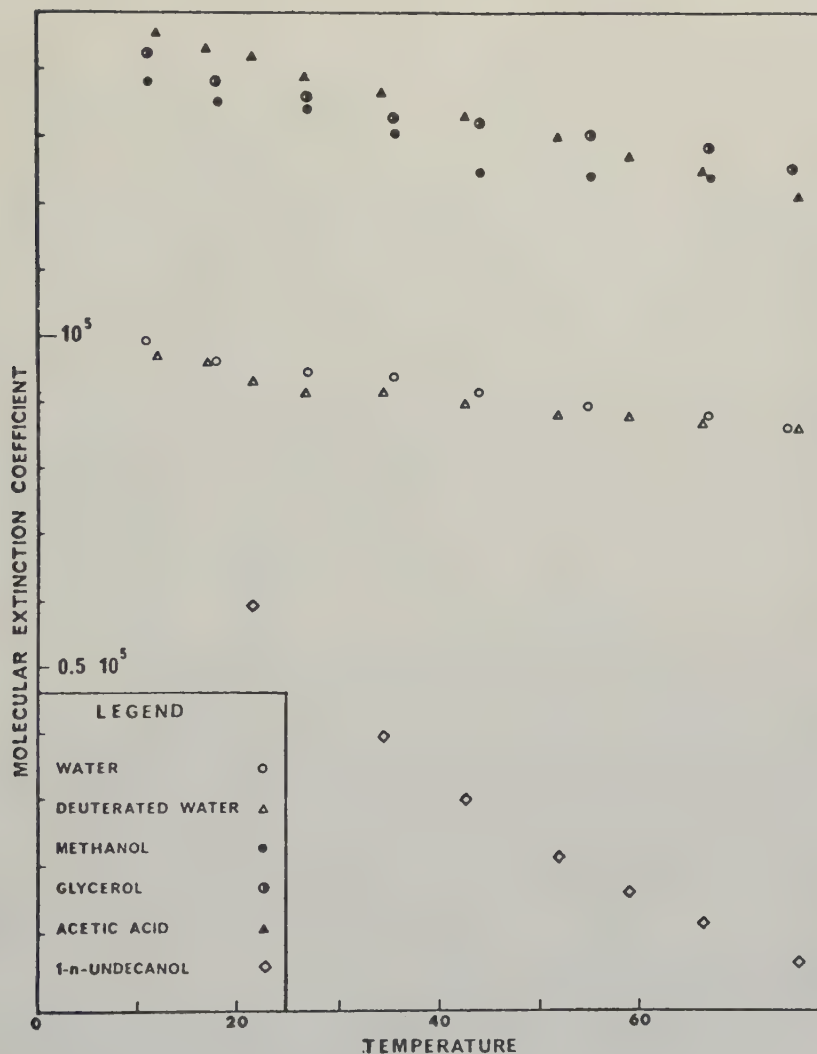


Fig. 1 : Evolution des coefficients d'extinction moléculaires des solutions de Rhodamine avec la température. Longueurs d'onde : $H_2O = 554$; $D_{20} = 552$; $MeOH = 544$; Glycérol = 561 ; acide acétique = 556 ; 1-n undécanol 546. Résolution : 1 nm. Conc. de Rhodamine $10^{-6} M$.

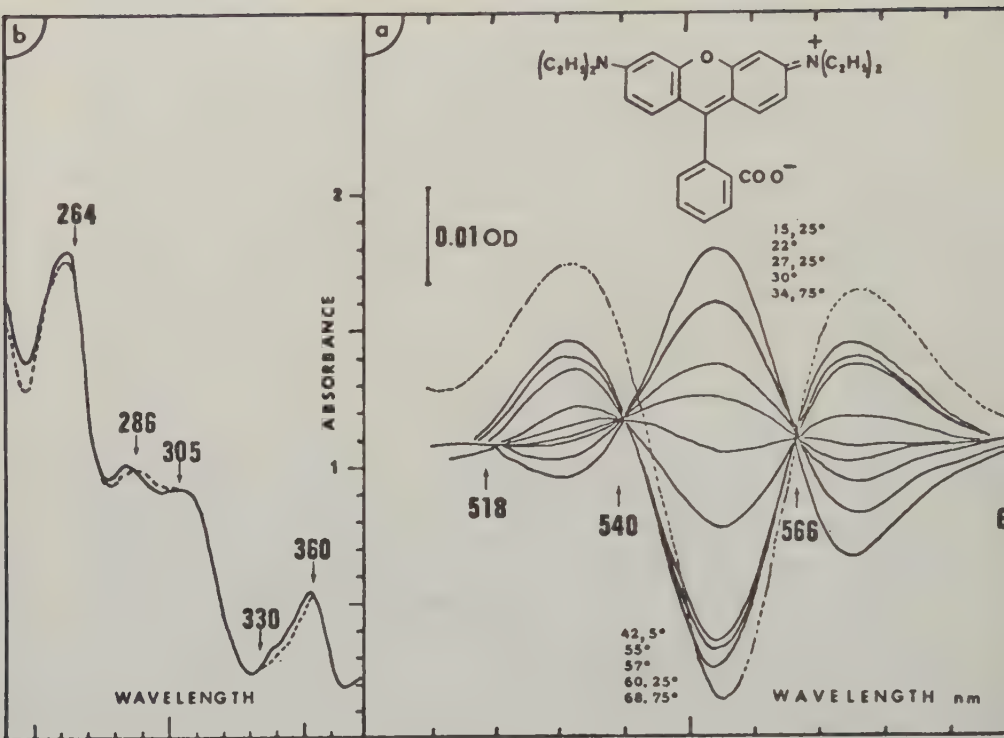


Fig. 2 : Apparition de points isobestiques dans les spectres d'absorption mesurés à différentes températures.

a) Solution 10^{-6} M en tampon borate 0,01M, pH 9,2. La cellule de référence est maintenue à 34°. Spectrophotomètre Cary 15, résolution 2,5 nm. Cellules de 10 mm de trajet optique.

b) Solution 6,25. 10^{-5} M en tampon borate. En traits pleins : échantillon à 19°C, en traits pointillés : échantillon à 70°C. Spectrophotomètre Perkin Elmer 402. Résolution à 300 nm : 0,15 nm.

Comme la figure 1, le tableau 1 montre que la grandeur mesurée décroît lorsque la température augmente.

La figure 2 montre que, dans l'eau, la décroissance du maximum d'absorption correspond à une évolution générale du spectre visible. Trois points isobestiques sont apparents dans le visible (fig. 2a) et plusieurs autres dans l'UV (fig. 2b). On obtient des résultats comparables dans D_2O , à la différence près que le maximum d'absorption dans le visible subit un léger glissement vers le bleu lorsque la température croît.

Dans la mesure où la figure 2 ne peut s'interpréter qu'en supposant un équilibre entre deux espèces, nous désignerons par R l'espèce dont la concentration croît avec la température, F étant l'autre : rappelons, en outre, que nous sommes tentés de supposer que R n'est pas fluorescent.

Voici quelles sont les expériences qui ont été tentées pour déplacer l'équilibre R-F, et surtout pour éliminer la possibilité que l'une des formes résulte d'une interaction réversible de l'autre avec une impureté :

1°) Effet de la dilution sur le coefficient d'extinction : les mesures ont été faites dans NaOH 0,1 M.

Il apparaît que les coefficients d'extinction à 555 nm, à 525 nm et à 355 nm (longueurs d'onde qui correspondent à deux des maxima d'absorption et à un épaulement) évoluent avec la concentration du chromophore. Nous sommes partis de $10^{-4}M$, et avons opéré des dilutions par un facteur 2 jusqu'à $10^{-7}M$, en adaptant la longueur des cuves de mesures pour avoir une densité optique supérieure à 0,025. La variation de D.O. est insignifiante aux concentrations inférieures à $10^{-5}M$. La concentration augmente jusqu'à $10^{-4}M$, le coefficient d'extinction à 555 décroît et les deux autres croissent. Cette évolution est contrariée par l'augmentation de température. L'ensemble de ces manifestations ont été largement décrites : on les attribue à la dimérisation du colorant (7, 10).

2°) Effet de la dilution sur la fluorescence :

Le signal de fluorescence émis à 20°C par une solution du chromophore dans l'eau tamponnée à pH 9,2 (borate 0,01 M) a été observé au long de dilutions successives par deux, entre $10^{-6}M$ et $10^{-9}M$ (au-delà de cette dernière valeur, notre instrument cesse de donner un signal se distinguant du bruit de fond). C'est une fonction linéaire de la concentration.

3°) Effet du pH :

On trouve que le spectre de différence entre trois solutions de concentration $10^{-6}M$, l'une dans un tampon acétate (pH 5,5) l'autre dans un tampon borate (pH 9,2) et la troisième dans NaOH 0,1 M est plat entre 330 nm et 600 nm. On peut constater que l'évolution du spectre d'absorption avec la température persiste aussi en milieu acétique (fig. 1) en dépit du fait que le spectre mesuré ait subi un glissement vers le rouge (il en est de même dans ce cas du spectre d'émission (20)).

4°) Effet de la concentration en gaz :

Un certain nombre de difficultés ont dû être surmontées : lorsque des bulles de gaz sont produites à l'intérieur d'une solution $10^{-6}M$, dans 0,1 M NaOH, la solution se décolore irréversiblement (le test a été effectué en faisant barboter de l'oxygène, de l'azote, du CO_2 , de l'argon et de l'air, ainsi qu'en mettant les solutions sous pression réduite pour les dégazer). Cet effet a déjà été observé (21). Il s'agit vraisemblablement d'un effet d'entraînement. Il peut être évité en tant qu'artefact en augmentant la concentration de gaz par augmentation de la pression partielle du gaz au-dessus de la solution. Lorsque la pression de l'air est ainsi augmentée de 1 à 2,2 atmosphères, il ne se passe rien au point de vue du spectre d'absorption. Dans les mêmes conditions, la décroissance du signal de fluorescence est de l'ordre de 5 %. Nous constatons que c'est la différence que l'on observe entre les solutions aqueuses désoxygénées et non désoxygénées.

Afin d'alléger la discussion, nous présentons immédiatement les conclusions de ces expériences :

- Les expériences 1 et 2 permettent d'éliminer l'éventualité qu'une impureté 1, présente dans notre préparation initiale de Rhodamine, réagisse réversiblement avec l'une des deux espèces pour donner l'autre, car en diluant, on déplace l'équilibre en faveur de l'espèce "pure".

- L'expérience 3 montre qu'il ne s'agit pas d'un équilibre entre formes "acides" et formes "basiques" de la molécule (rappelons que le pK d'ionisations du groupement $COOH$ est de l'ordre de 3,5 (14-16)).

- L'expérience 4 permet d'éliminer l'hypothèse d'une réaction avec une impureté qui présente la particularité de ne pas pouvoir être diluée, et de changer de concentration avec la température : les gaz dissous.

Ces quatre expériences laissent la place à une cinquième interprétation qui est la présence d'une impureté non gazeuse dissoute dans le solvant. Il ne s'agit pas, en ce cas, d'un des électrolytes (borate, soude, etc...) que nous avons ajouté. En effet, toutes les mesures présentées ici ont également été faites sur des solutions ne contenant que de la Rhodamine B dans de l'eau bidistillée, et montrent que l'équilibre R-F persiste. La nature de la cuve de mesure (pyrex, quartz, téflon F. E. P.) n'influe pas davantage sur cet équilibre.

La dernière interprétation est que le rôle d'impureté peut être tenu par le solvant lui-même et, comme on le verra, c'est celle que nous retiendrons de préférence à l'hypothèse de tautomérisme.

DISCUSSION

Il semble difficile de concilier l'existence de points isobestiques avec un modèle théorique (4) selon lequel le spectre d'absorption d'une espèce pure évolue avec la température. Nous ferons donc l'hypothèse que l'évolution du coefficient d'extinction, à une longueur d'onde donnée, correspond à l'évolution de la composition d'un mélange de deux espèces possédant des coefficients d'extinction respectifs ϵ_F et ϵ_R indépendants de la température.

La figure 3 illustre, dans ces conditions, les deux aspects qui intéressent la discussion de ce problème :

- le premier est que le coefficient mesuré à une température donnée dépend de plusieurs paramètres (coefficients d'extinction moléculaire des deux constituants du mélange, et paramètres de la relation d'équilibre entre ces constituants),
- le deuxième est que, moyennant un changement de coordonnées qui nécessite la seule connaissance des paramètres d'équilibre, les grandeurs mesurées s'échelonnent sur une droite qui fournit les valeurs des coefficients d'extinction limites.

Comment déterminer les paramètres de l'équilibre ? Une méthode a été décrite (22), mais elle consiste à supposer que la constante d'équilibre ne dépend que d'un seul paramètre, invariant avec la température dans la gamme de températures explorées : la variation ΔG d'enthalpie libre. Une autre méthode (23) permet l'exploitation directe des mesures effectuées en spectroscopie différentielle : elle reproduit la variation de l'équilibre en fonction de l'entropie et de l'enthalpie du système. Nous exploiterons ici une

effect of the change of coordinate $T \rightarrow X = \frac{K}{1+K}$

$$K = \frac{|B|}{|A|}$$

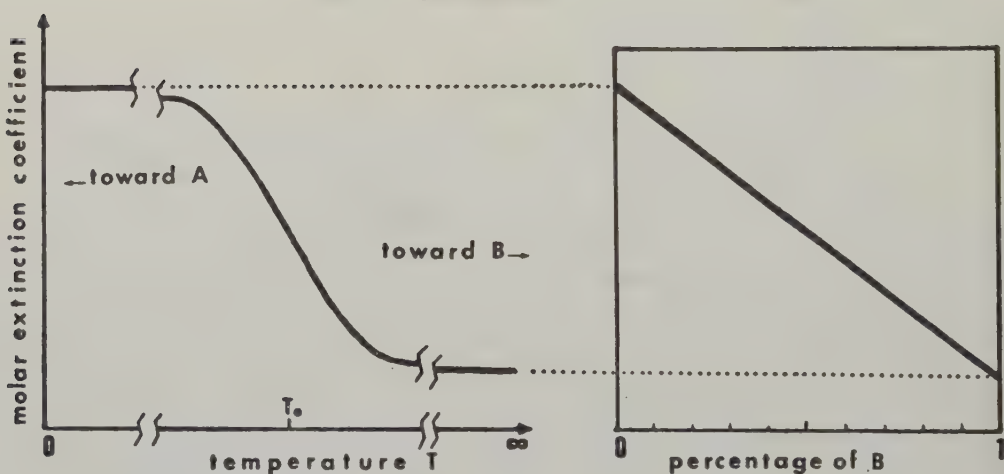


Fig. 3 : Le coefficient d'extinction d'un mélange de deux espèces A et B en équilibre évolue d'une façon sigmoïdale avec la température, mais sa variation reste proportionnelle à la concentration d'une des deux espèces, dans l'hypothèse où le coefficient d'extinction de chacune d'elles n'évolue pas avec la température.

troisième méthode. Voici en quoi elle consiste :

1°) Nous établirons que le déplacement de l'équilibre du système est seul responsable de l'évolution de la fluorescence avec la température.

2°) Nous déterminerons les paramètres de cette dernière évolution (extinction) en faisant l'hypothèse que l'un des composants du système (R) est une espèce de fluorescence nulle –ou d'un d'ordre de grandeur négligeable (R ne contribue pas significativement à la fluorescence du système).

Voici sur quoi s'appuie la démonstration du premier point : les mesures de polarisation de fluorescence des solutions diluées de Rhodamine dans l'eau (24) montre que cette quantité décroît avec la température. Si pourtant la durée de vie de fluorescence diminuait dans les proportions que laissent prévoir les mesures de rendement quantique, on devrait s'attendre à une augmentation de la polarisation. En ce qui concerne le glycérol, on observe également (25) une augmentation de la dépolarisation, et il a été montré (5) que cette augmentation rendait compte de l'abaissement de viscosité du milieu à la seule condition que l'on considère la durée de vie de la fluorescence comme un quasi invariant. Cette simple constatation (valable au demeurant pour d'autres colorants, comme la fluorescéine), suggère que la décroissance de durée de vie n'est pas seule responsable de l'extinction de fluorescence.

Terminons notre démonstration du premier point : en comparant les résultats de la figure 2 et du tableau I, nous obtenons la figure 4. Cette figure montre qu'il semble exister entre la densité optique et la fluorescence une relation polynomiale du premier degré (il en est de même pour les résultats de la figure 1, dans le cas du glycérol et de l'eau).

Or, si nous nous reportons à la figure 3, nous constatons que l'existence d'une relation simple entre le coefficient d'extinction et la constante d'équilibre $K(T)$ peut être transposée à la fluorescence, si le signal de fluorescence émis par les deux espèces en équilibre (dans la figure : A et B) n'évolue pas avec la température.

Si l'on obtient une droite en portant les mesures d'absorption en fonction d'une certaine fonction de la température, et si l'on obtient aussi une droite en portant les mesures de fluorescence en fonction de la même fonction de la température, alors on doit obtenir encore une droite en portant les mesures de fluorescence en fonction des mesures d'absorption effectuées à la même température.

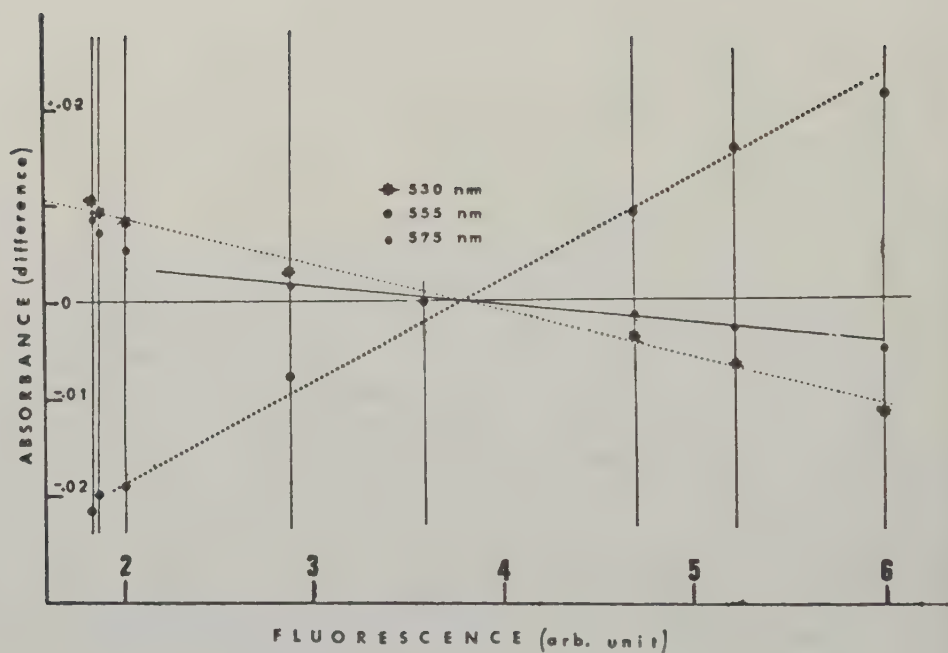


Fig.4 : Il existe une certaine corrélation entre les mesures de fluorescence (tableau I) et l'évolution de la densité optique des solutions (fig. 2) Les densités optiques sont présentées comme différence entre la valeur lue et la valeur à 34,5°C. Les températures sont, de droite à gauche : 15, 25 ; 22 ; 27, 25 ; 34, 75 ; 42, 5 ; 55 ; 57 ; 60, 25.

La figure 4 démontre donc que tel est le cas, et il est difficile (voir appendice G) de proposer une autre solution qui conduise à ce type de corrélation.

Nous soulignons que cette constatation n'implique aucune hypothèse, concernant la nature de l'équilibre entre R et F, aussi bien que la fluorescence, ou l'absence de fluorescence, de l'espèce R.

Ce sont ces hypothèses supplémentaires que nous devons faire, maintenant. La première consiste à supposer que l'équilibre R-F s'effectue à partir des niveaux non excités des formes R et F, et que ces niveaux ne se déplacent pas en fonction de la température. La deuxième hypothèse est que la fluorescence de R peut être tenue pour négligeable.

Nos hypothèses se justifient par le fait qu'elles sont seules susceptibles de rendre compte de la relation (1) où, comme nous allons le montrer, de relations très voisines de 1.

Si ces deux hypothèses sont admises, on peut écrire :

$$(2) \quad \frac{F(0) - F(T)}{F(T)} = k_0 \exp - \frac{\Delta W}{kT}$$

où $F(T)$ et $F(0)$ sont les intensités de fluorescence correspondant aux températures $0^\circ K$ et $T^\circ K$, et le terme de droite est le développement de la constante d'équilibre $K = R / F$.

Notons que lorsque l'on écrit cette relation en terme de rendements quantiques, le terme de gauche devient
$$\frac{\Phi(0) - \Phi(T)}{\Phi(T)}$$

et non pas $\frac{1}{\Phi(T)} - 1$ comme on écrit le plus souvent. Il n'est pas implicite que le rendement quantique de fluorescence à $0^\circ K$ est l'unité.

La relation (2) comporte trois paramètres inconnus. Voici comment nous avons procédé pour les ajuster : la quantité $F(0)$ (ou $\Phi(0)$) a été déterminée par ajustements successifs de façon à minimiser (dans l'approximation des moindres carrés) les écarts entre $F(T)$ théoriques et mesurés, étant entendu que les $F(T)$ théoriques devaient satisfaire à la relation (2).

Les valeurs de ΔW (qui représente la différence d'enthalpie entre le niveau fondamental de R et celui de F) et de k_0 (à partir duquel on peut calculer la différence d'entropie entre les formes R et F ont été déduites) qui ont

TABLEAU II

RESULTATS DE LA SIMULATION DE L'EXTINCTION DE FLUORESCENCE

Signal ou rendement à T = 0°K	de haut en bas : signal calculé et signal mesuré											Expression de la constante d'équilibre de l'on Arrhénius
SOLVANT :	74,11	71,35	63,76	59,70	55,54	43,27	39,44	32,43	29,28	23,76	21,37	$\Delta W = 8,23 \text{ kcal/mole}$
GLYCEROL :	75	70	64	60	55	44	40	32	28	25	21	$K = \exp. (14,02 - \frac{4136}{T})$
SOLVANT :	6,03	5,16	4,51	3,73	2,94	2,03	2,01	1,89	1,74			$\Delta W = 7,21$
EAU :	10,32	6,00	5,22	4,67	3,58	2,87	1,92	2,09	1,86	1,83		$K(T) : \exp. (11,22 - \frac{3633}{T})$

permis de calculer $F(T)$ théorique, sont présentées dans le tableau 2. Pour les valeurs $F(0)$ qui ont été retenues, l'écart standard sur la détermination de ΔW peut être évalué à 0,2 kcal/mole.

La quantité $F(0)$, estimée pour l'eau, a été utilisée pour extrapoler les résultats de la figure 2a, selon la méthode employée figure 4, de façon à obtenir les spectres d'absorption des espèces F et R (fig. 5). Comme nous le supposions plus haut, ces spectres d'absorption sont très voisins. Ils sont présentés à titre qualitatif. La précision sur la détermination de la densité optique de F et de R, à une longueur d'onde donnée, est de l'ordre de 10 %. On notera comment R absorbe significativement plus que F dans la partie rouge du spectre (575 nm).

Le rendement quantique de fluorescence de l'espèce F est très voisin de l'unité, dans le glycérol. Il est probable qu'il en est de même pour l'eau, ce qui s'accorde avec l'observation (26) que les niveaux triplets de la Rhodamine sont difficiles à peupler.

Malgré un déficit considérable en enthalpie (8,2 kcal/mole pour l'eau, 7,21 kcal/mole pour le glycérol), l'espèce R reste présente en proportion conséquente, ce qui s'explique par le gain d'entropie. Il est intéressant de confronter cela avec les observations de Tarasova (27), qui propose un parallélisme entre l'énergie d'activation de l'extinction de fluorescence et l'énergie d'activation de la relaxation diélectrique :

Nous trouvons ici que la différence d'enthalpie passe de 8,23 en milieu faiblement ionisé à 7,49 (NaF 0,1 M), 6,55 (NaOH 0,1 M) et 6,13 (NaOH 0,1 M + NaF 0,1 M). Il semble donc que la force ionique ait un rôle à jouer.

Comme on l'a montré (12), l'effet de la soude concentrée est de décolorer les solutions aqueuses. Il n'est pas impossible, toutefois, que ce soit un effet de "salting out" (on décolore les solutions de Rhodamine en augmentant la concentration de NaF ou de sulfate d'ammonium).

I. S. Ioffe a mené sur la Rhodamine et ses dérivés une enquête très complète, et montre en particulier que l'on peut modifier considérablement le rendement quantique de ces molécules (entre $\Phi = 0,06$ et $\Phi = 1$) en modifiant la nature des substituants sur les groupements azotés (28). Il montre que l'on obtient des rendements quantiques supérieurs en remplaçant le groupement éthyl de la Rhodamine B par des butyl (29) : il nous semble que ces modifications sont de nature à renforcer la structure quinoïde, dont on croit savoir qu'elle a la forme colorée, par opposition à la forme lactone, incolore (11).

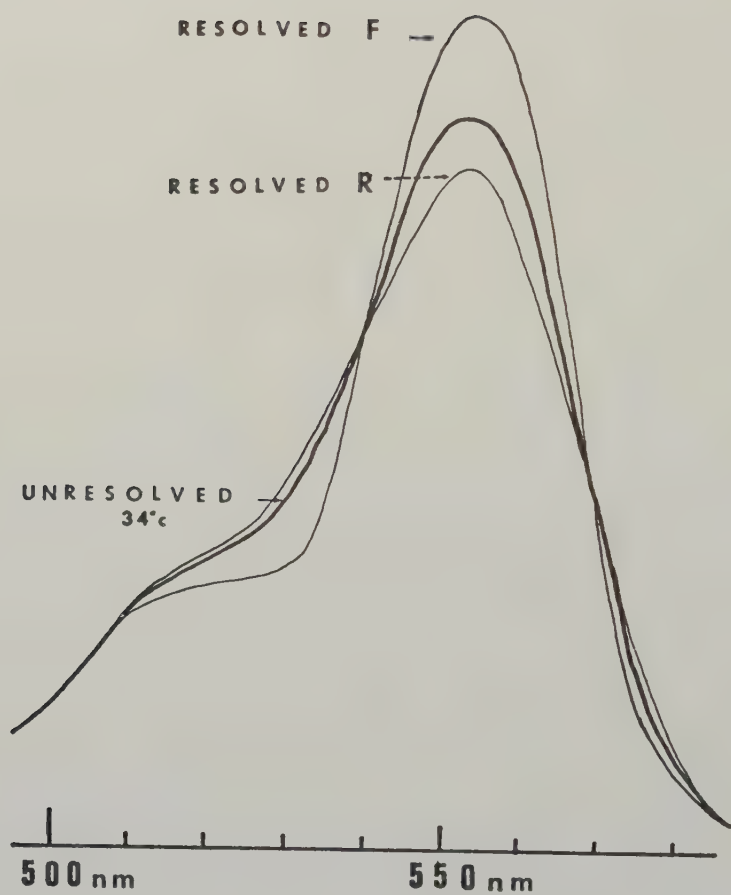


Fig. 5 : Voir texte.

Nous pensons que la forme R est une forme intermédiaire entre la forme lactone et la forme F, dans le sens que voici :

Il pourrait y avoir entre ces formes, la variation d'enthalpie qui correspond à la fixation d'une ou plusieurs molécules de solvant (et il est connu que l'énergie d'activation de la relaxation diélectrique reflète l'énergie d'interaction entre molécules de solvant), et la variation d'entropie correspondant à l'organisation plus ou moins rigide de molécules de solvant autour du colorant. Dans cette hypothèse, on devrait observer que la forme F est fortement solvatée, la forme R moins solvatée, et, probablement, la forme lactone non solvatée. Si ce modèle est exact, on doit observer un changement de rendement quantique de fluorescence lorsqu'on "deshydrate" progressivement la molécule, en particulier dans les mélanges binaires eau-dioxane, ou méthanol-CCl₄. Il est clair que ce changement doit s'accompagner de variations mesurables dans le profil du spectre d'absorption (12, 8) (l'examen des spectres publiés nous montre précisément que la décoloration ne se fait pas par diminution homothétique du coefficient d'extinction : on peut remarquer des perturbations au niveau de l'épaule à 525 nm).

On observe dans les solvants très peu polaires, comme le n undécanol, un passage de la forme colorée à la forme incolore par simple chauffage (fig. 1), ce qui suggère soit que la forme R et la forme lactone sont identiques, soit que trois espèces (dont la forme lactone) sont présentes en proportions consécutives dans ce solvant. L'examen du rendement quantique doit permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

Nous concluons donc le présent exposé par une série de points d'interrogation : qu'est-ce au juste que l'espèce R ? Pourquoi est-elle peu fluorescente ? L'interprétation qui consiste à expliquer l'effet de la température sur le rendement quantique de fluorescence par un mécanisme n'opérant pas au niveau excité est-elle généralisable à d'autres chromophores fluorescents ? Il est certain que des techniques plus élaborées, notamment : mesure de déclins de fluorescence, et examen des spectres RMN, permettront de résoudre plusieurs de ces questions. Les simples données spectrophotométriques que nous avons recueillies nous permettent d'avancer que le type d'équilibre dont il vient d'être fait état est largement répandu, en solution aqueuse tout au moins.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) W. E. SPEAS : Phys. Rev. 31, 569 (1928)
- 2) A. V. ARISTOV & E. N. VIKTOROVA : Bull. Ac. Sci. USSR, 34, 645 (1970)
- 3) G. WEBER & F. W. TEALE : Trans. Far. Soc. 54, 640 (1958)
- 4) J. HEVESI & L. KOZMA : Acta Phys. Hungar. 20, 351 (1966)
- 5) E. TOMBACZ, L. WIZE & L. SZALAY in : Proc. Int. Conf. Lumin. 1966, 1, 285
Ed. Szigeti G. Akad. Kiado, Budapest (1968)
L. SZALAY & L. KOZMA : Acta Phys. Hungar. 20, 389 (1965)
- 6) P. PRINGSHEIM in "Fluorescence and phosphorescence" Wiley and sons (1969) p. 99
voir aussi : H. H. SELIGER & W. D. Mc ELROY "Light : Physical and biological
action" Ac. Press (1965) p. 99
- 7) W. C. HOLMES : Ind & Eng. Chemistry, 16, 35 (1924)
- 8) E. RABINOWITCH & L. F. EPSTEIN : J. Am. Chem. Soc. 69, 63 (1941)
- 9) K. K. ROHATGI & G. S. SINGHALL : J. Phys. Chem. 70, 1695 (1966)
- 10) J. SELWYN & J. STEINFELD : J. Phys. Chem. 76, 762 (1972)
- 1) E. NOELTIG & K. DJIEWONSKI : Ber. 38, 3516 (1905)
- 2) A. GUTSZE & H. WALERY'S : Acta Phys. Polonica, 23, 581 (1963)
- 3) I. S. IOFFE & A. L. SHAPIRO : Zh. Org. Khim. 8, 1726 (1972)
- 4) F. E. RAY & M. L. JUNG : Brit. J. Cancer, 5, 358 (1951)
- 5) S. WOILAVSKI : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 390 (1952)
- 6) R. W. RAMETTE & E. B. SANDELL : J. Am. Chem. Soc. 78, 4872 (1956)
- 7) S. WOISLAWSKI : J. Am. Chem. Soc. 75, 5201 (1953)
- 8) J. FERGUSON & A. W. H. MAU : Chem. Phys. Letters, 17, 543 (1972)
- 9) M. LAIKIN : Rev. Sci. Inst. 34, 773 (1963)
- 10) C. W. SILL : Anal. Chem. 33, 1579 (1962)
- 11) A. B. CARAGAY, B. L. KARGER : Anal. Chem. 38, 652 (1956)
- 12) A. MOSCOWITZ, K. WELLMAN & C. DJERASSI : J. Am. Chem. Soc. 85, 3515 (1963)
- 13) J. J. BOURGARIT : Thèse, Paris, chap. VI
- 14) P. P. FEOFILOV : "The physical basis of polarized emission" consultant bureau,
N. Y. (1961) pp. 148-155
- 15) P. P. FEOFILOV & B. Ya. SVESHNIKOV : Doklady Akad. Nauk. USSR, 115, 854 (1957)
- 16) A. I. CHIBISOV, H. A. KEGLE, L. V. LEVSHIN, T. D. SLAVNOVA : J. C. S. Chem.
Com. 1972, 1292
- 17) T. M. TARASOVA : Zh. Eksperimental i terret. fiz. 21, 189 (1951)
- 18) I. S. IOFFE & I. A. GOFFMAN : Zh. Obsch. Khim. 34, 2039 (1964) (CA 61 10.000a)
- 19) I. S. IOFFE & M. Z. ZAL'MANOVICH : Zh. Org. Khim. 1, 2172 (1965) (CA 64 12.846a)

CHAPITRE TROIS *

Nouvelles données sur l'extinction de la fluorescence de la Rhodamine B par l'iodure de potassium

R E S U M E

Le spectre d'absorption des solutions aqueuses de Rhodamine B évolue lorsqu'on ajoute de l'iodure de potassium. L'examen des signaux de fluorescence correspondants permet de proposer qu'une réaction d'équilibre stoechiométrique, de rapport 1/1, conduit à l'apparition d'une nouvelle espèce fluorescente. La constante d'équilibre, à la température ambiante est de $4,9 \text{ L. M}^{-1}$.

* Voir appendices D, F, G et I.

INTRODUCTION

L'examen des données expérimentales publiées jusqu'à présent montre qu'il existe un problème relatif à l'extinction de fluorescence de la Rhodamine B par l'iodure de potassium. Voici en quels termes ce problème peut être posé : il y a contradiction entre l'évidence, fournie par Frank et Vavilov (1) que la polarisation de l'émission de fluorescence du chromophore croît lorsque la concentration en sel croît (ce qui est interprété comme une décroissance de la durée de vie) et les mesures de Lucatu (2) qui tendent à montrer qu'une réaction d'aggrégation se produit, en l'absence d'excitation des molécules. L'extinction est-elle une réaction d'équilibre entre une forme fluorescente et une forme non fluorescente, ou une réaction cinétique (Stösse zweiter art) ? Les deux modèles permettent d'expliquer l'extinction, dans la mesure où peut s'appliquer la représentation classique de Stern-Volmer (3), c'est-à-dire lorsque l'on peut observer une variation linéaire de l'inverse du signal de fluorescence en fonction de la concentration d'extincteur. Le premier de ces modèles a été repris récemment (4, 5) (pour des Rhodamines autres que la Rhodamine B). Le deuxième, modifié par la théorie de Jablonski (6) reçoit le poids de plusieurs confirmations expérimentales (7-9). Une dernière possibilité est offerte par la mise en évidence de deux formes en équilibre de la Rhodamine B (10) : l'iodure de potassium, ainsi que d'autres sels, pourraient-ils agir sur la constante de l'équilibre entre la forme fluorescente F et la forme non fluorescente R ? Pas plus que l'hypothèse d'aggrégation cependant, un tel modèle ne permet d'expliquer l'augmentation de polarisation du signal de fluorescence émis par la molécule "quenchée".

Il existe pourtant une façon de réconcilier cette observation avec les modèles d'équilibre : s'agissant d'un équilibre entre une forme très fluorescente et dont le signal est presque totalement dépolarisé, et une forme de fluorescence faible dont le signal est très polarisé, on montre aisément que le déplacement d'équilibre en faveur de cette dernière conduira à une augmentation de la quantité appelée "polarisation de fluorescence". On peut observer que dans cette hypothèse :

1°) la représentation de Stern Volmer ne s'applique pas rigoureusement, sinon à très faible concentration d'extincteur, ce qui est notoirement le cas (11).

2°) à forte densité optique des solutions, l'excitation des molécules les plus fluorescentes sera filtrée par la présence de molécules absorbantes et moins fluorescentes, de sorte que la géométrie des cuves de mesure peut conduire, pour des solutions de concentrations comparables, à des observations divergentes (comme le sont par exemple celles des réf. 1 et 2).

3°) On devrait observer des déformations significatives du spectre d'absorption en corrélation avec l'évolution du signal de fluorescence. Il n'y a pas de données expérimentales sur ce troisième point, et ce sont donc celles que nous rechercherons tout d'abord.

Dans l'étude qui va suivre, nous nous fixons pour but d'examiner la validité de l'hypothèse qui vient d'être proposée, et qui est que l'iode réagit stoechiométriquement, dans un rapport 1/1/, avec le colorant, pour donner un dérivé fluorescent. Les autres hypothèses seront énoncées, sans être considérées plus avant, car elles seront examinées plus spécifiquement dans le chapitre suivant.

MATERIEL ET METHODES

La Rhodamine B (Baker) a été préparée ainsi que décrit précédemment (10). L'iodure de potassium est un réactif Merck (classe "suprapur"). Les diverses mesures présentées ici ont été effectuées sur un volume de 4 ml de solution, dans lequel ont été ajoutées des "doses" de 100 μ l d'une solution IK, 4 M dans la solution de colorant. Toutes les mesures sont effectuées, ainsi qu'il a été décrit précédemment (10) en présence d'oxygène atmosphérique. On remarquera que la concentration de Rhodamine utilisée (10^{-6} M) et la géométrie des cellules de mesure (10 mm de trajet optique) sont telles que l'effet de filtre interne n'est pas à redouter. La perturbation introduite par la modification de l'indice de réfraction consécutive à l'addition du sel neutre peut être, en première approximation, considérée comme négligeable.

RESULTATS

La figure 1 représente les spectres de différence, obtenus à température constante (25°C) en fonction de la concentration d'iodure ajoutée à la solution de Rhodamine 10^{-6} M. Ces spectres ont été enregistrés entre 450 nm et 850 nm (la présence éventuelle de l'ion coloré I_3^- est exclue par le fait que la densité optique à 450 nm, longueur d'onde située à l'intérieur de la zone

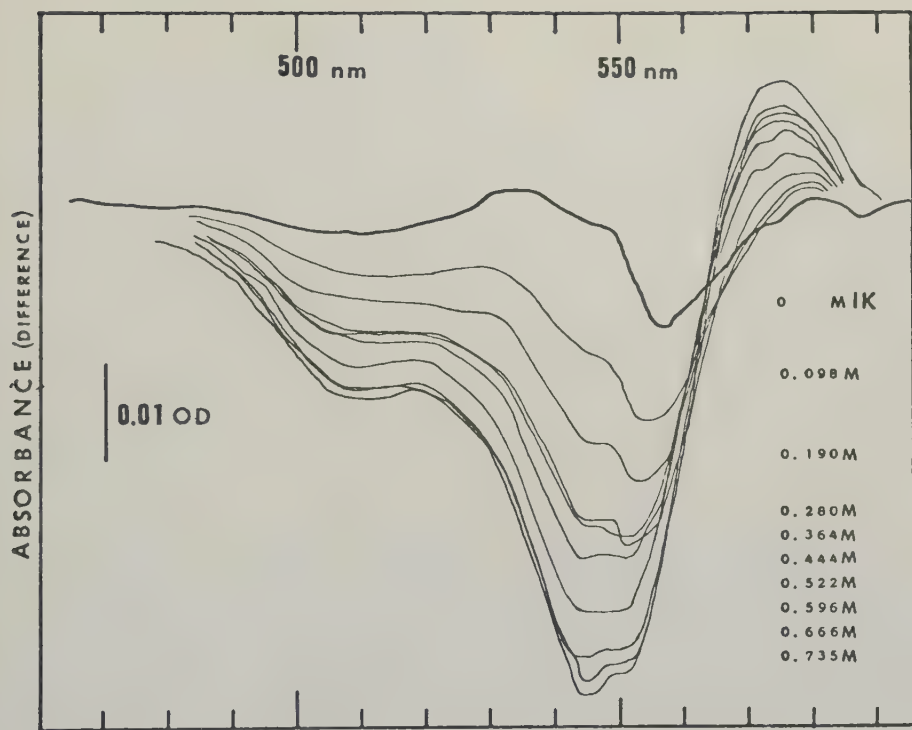


Fig. 1 : Spectres de différence obtenus en faisant varier la concentration d'iodure de potassium dans un échantillon de concentration 10^{-6} M en Rhodamine. La ligne en traits gras est la ligne de base. Spectrophotomètre Cary 15. Résolution 0,25 nm. Cellules de mesure 10 mm, thermostatées à 29°C.

d'absorption de l'ion et à l'extérieur de celle du colorant n'évolue pas). Il n'a été présenté dans la figure que la partie du spectre qui évolue.

Il convient de souligner que ces mesures sont difficiles : en dehors du type de résultat présenté ici, et qui a été reproduit le plus souvent, on peut obtenir, par addition d'IK, des effets beaucoup plus "soutenus" comme la décroissance considérable du pic d'absorption à 550 nm, ou encore un glissement notable de ce pic vers le rouge. Le premier effet n'a jamais été obtenu dans des solutions ne contenant pas NaOH, et peut être éliminé irréversiblement en portant une fois les solutions à une température supérieure à 50°C. Le second s'accompagne d'une augmentation notable de la diffusion des solutions, et est à rapprocher des observations de Lucatu (12-14). Cet effet nous semble lié à la présence d'impuretés microscopiques dans la solution (poussières, colloïdes) : les agrégats, sédimentés dans une ultracentrifugeuse, se redissolvent au fond, et la solution retrouve définitivement sa limpidité. (les observations du spectre de différence montrent que, dans ce cas, on obtient par addition d'IK un point isobestique à 558 nm).

Il n'y a pas à proprement parler dans la figure 1, de point isobestique mais une figure en "S" dont l'intersection avec la ligne de base glisse de l'abscisse 567 nm à l'abscisse 560 nm (la résolution instrumentale étant de 0,2 nm).

Le tableau I donne, pour les mêmes concentrations en IK et à la même température, les intensités de fluorescence et les densités optiques à 555 nm représentées en unités de DO. La fluorescence du colorant est excitée à 545 nm.

Nous soulignerons deux détails concernant les mesures de fluorescence : le premier est que l'on obtient un signal de fluorescence significativement différent de zéro à des concentrations en iodure de potassium dépassant 5M. Le deuxième est que, dans ces mêmes conditions, l'intensité de fluorescence décline fortement lorsque l'on élève la température. Cet effet fera l'objet d'un traitement plus détaillé ailleurs (15).

Le spectre corrigé d'excitation de fluorescence a été enregistré à cinq concentrations d'iodure de potassium s'échelonnant entre 0 et 0,2 M IK : les tracés obtenus sont homothétiques, donc la longueur d'onde d'excitation ne joue pas un rôle déterminant. Le spectre d'excitation en présence de IK 5M n'est pas significativement différent (fig. 2) du spectre d'absorption dans les mêmes conditions.

CONCENTRATION IODURE DE POTASSIUM	INTENSITE DE LA FLUORESCENCE (température : 26°C)	ABAISSEMENT DE LA DENSITE OPTIQUE à 555 nm (température : 28, 25°C) *
0,0	21,75	0
0,008	15,25	0,011
0,190	12,4	0,017
0,280	10,25	0,023
0,364	9,3	0,021
0,444	8,45	0,022
0,522	7,8	0,025
0,596	7,35	0,029
0,666	6,95	0,030
0,735	6,65	0,030

* La densité optique initiale à 555 nm est de 0,1.

TABLEAU I

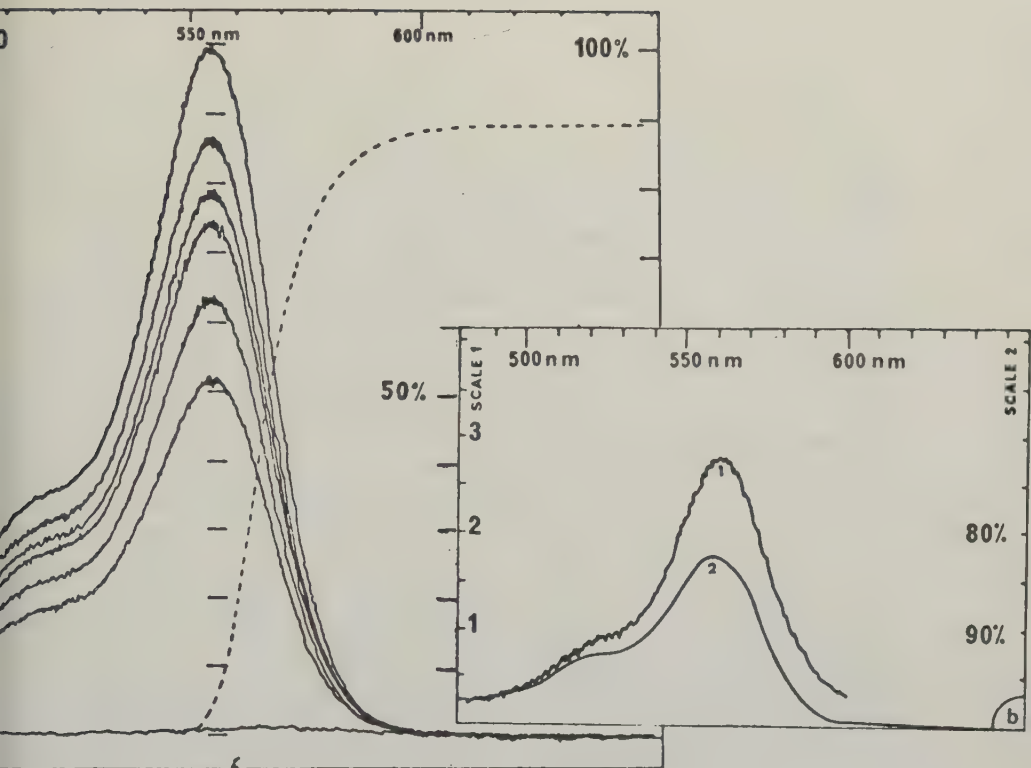


Fig. 2 : Spectres d'excitation de fluorescence d'une solution 10^{-6} M en tampon borate 0,01 M, pH 9,2

a) Les spectres sont obtenus à diverses concentrations d'iodure de potassium : de haut en bas : 0 M ; 0,04 M ; 0,06 M ; 0,08 M ; 0,125 M ; et 0,2 M. L'instrument est un Cary 17 muni d'un accessoire d'excitation de fluorescence ; il fonctionne en double faisceau – la voie référence est utilisée comme convertisseur de photon. On a cherché à mettre en évidence un phénomène de diffusion Rayleigh, qui n'apparaît pas. Le spectre de transmission du filtre d'émission est présenté en pointillés (voir l'échelle sur la droite). Température : 23,5°C.

b) La concentration en iodure de potassium est de 5 M. Le spectre d'excitation (1) a été obtenu comme ci-dessus. Le spectre d'absorption (2) du même échantillon, porté en unités de transmission (échelle de droite) est apparemment homothétique de (1).

DISCUSSION

Nous montrons ici, pour la première fois, que l'introduction d'iodure de potassium dans une solution de Rhodamine B entraîne une perturbation qui est de nature à déformer le spectre d'absorption (fig. 1). Est-ce une déformation continue, résultat de modification des propriétés diélectriques du milieu (16) ou est-ce que cela traduit l'apparition d'espèces nouvelles dans le milieu ? Nous avons suggéré précédemment (10) que la solvation jouait un rôle important dans la présence d'une bande d'absorption de la Rhodamine dans le visible ; or, il est connu que IK "casse" la structure de l'eau, de sorte que la première hypothèse est recevable. Si nous choisissons la deuxième hypothèse, nous devons admettre qu'il y a plus de deux espèces en présence, ou plus exactement que les proportions relatives des espèces qui apparaissent du fait de la présence d'iodure de potassium dépendent de la concentration de ce sel. Une telle hypothèse serait compatible avec les observations de Greenbaum (17) selon lesquelles deux dérivés, respectivement monoiodé et diiodé, pourraient être obtenus avec IK, en présence de soude.

Comme nous l'avons annoncé, ces hypothèses seront examinées plus loin. Nous voulons examiner ici si l'on doit ou non écarter la possibilité d'une réaction stoechiométrique unique Iode + chromophore.

Nous choisirons de soutenir ici une troisième interprétation : il s'agit du cas intermédiaire où, d'une part, une espèce nouvelle apparaît dans la solution, d'autre part, les spectres respectifs de cette nouvelle espèce et des espèces initiales (R et F) glissent vers le rouge au fur et à mesure de l'introduction de sel.

Il est clair que c'est aux alentours du maximum d'absorption que ce glissement aura le moins d'effet sur la valeur du coefficient d'extinction.

Il est non moins clair que si les coefficients respectifs de ce que nous appellerons "le dérivé iodé Cq" et "le chromophore C" sont différents, le coefficient mesuré dans des conditions d'équilibre C-Cq sera intermédiaire, (nous supposons, précisons le, que l'addition d'iode ne perturbe pas l'équilibre R-F, et dès lors, l'ensemble des molécules R + F peuvent être considérées comme une seule espèce "imaginaire" : C - voir appendice I).

Si, enfin, cet équilibre est seul responsable de l'extinction de la fluorescence, on doit obtenir une relation simple (un polynôme du premier degré) entre la valeur du coefficient d'extinction mesurée à une concentration donnée d'iodures, et la valeur du signal de fluorescence mesurée dans les mêmes conditions (voir fig. 4).

$$X = \frac{KQ}{1+KQ}$$

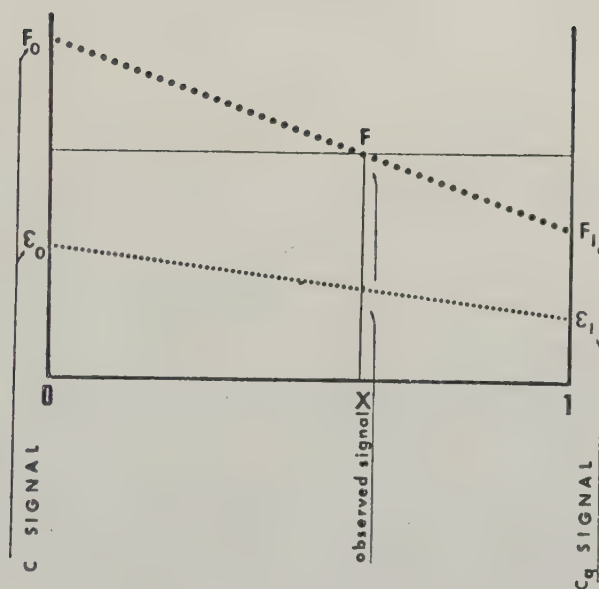


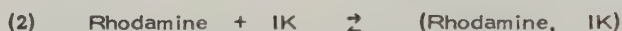
Fig.3 : Dans l'hypothèse où la perturbation du spectre d'absorption et l'extinction de fluorescence ont une même origine, une relation simple doit se dégager de l'observation de leur évolution. On peut admettre que les dix points obtenus à partir des données du tableau I se distribuent autour d'une droite.

La figure 3, obtenue à l'aide des résultats du tableau I, montre que c'est apparemment le cas. Il convient de souligner qu'une telle corrélation ne préjuge en rien de la nature de l'équilibre entre C et Cq, ni du fait que Cq soit ou non fluorescent : ce sont les questions auxquelles nous allons tenter de répondre à présent.

L'hypothèse la plus simple est que l'équilibre est gouverné par une loi du type

$$(1) \quad \frac{|Cq|}{|C|} = KQ$$

où K est la constante d'équilibre, et Q la concentration initiale d'agent extincteur (il est clair que, même si une réaction stoechiométrique du type



se produit, la quantité d'iode fixée, reste négligeable devant la quantité présente dans la solution.)

On peut déterminer, en s'appuyant sur le modèle présenté figure 4, la relation suivante :

$$(3) \quad \frac{F \cdot Q}{F_0 - F} = \alpha_F \frac{F_0 \cdot Q}{F_0 - F} + \frac{1}{K}$$

$$\text{où } \alpha_F = F_1/F_0,$$

F_0 étant le signal de fluorescence de l'espèce C,

F_1 , celui de l'espèce Cq, lorsque tout le chromophore est respectivement sous la forme C ou sous la forme Cq.

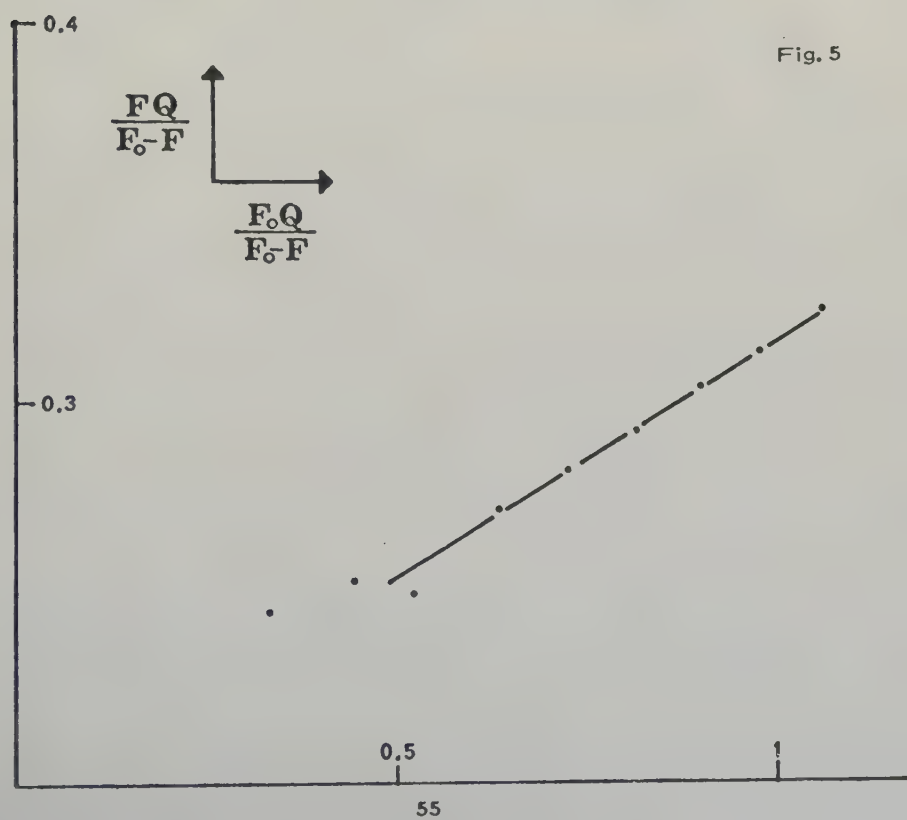
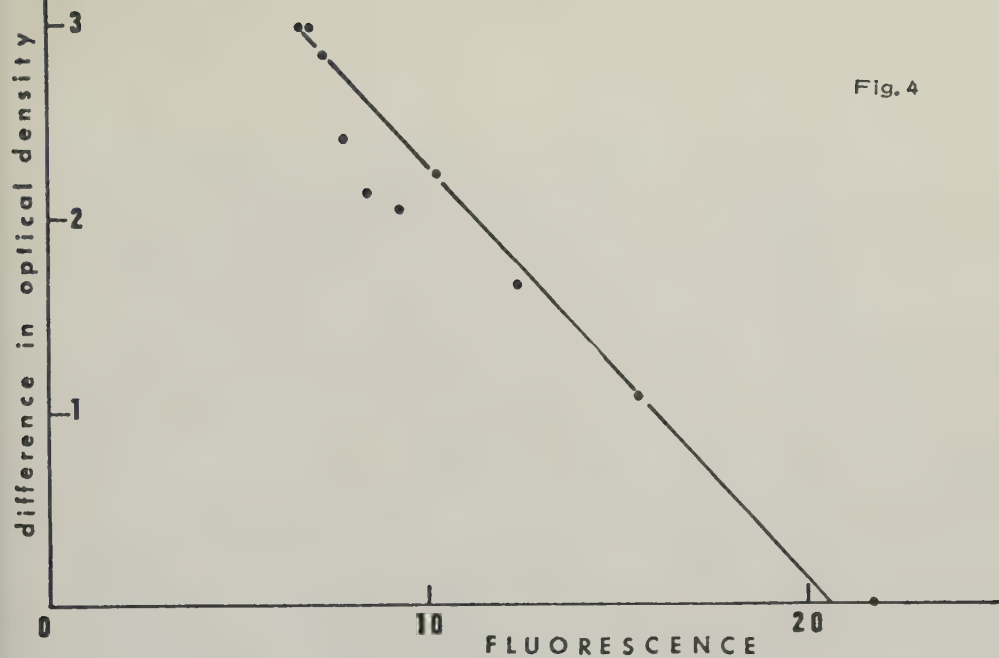
(Cette relation est valable quel que soit F_1 , et dérive immédiatement de la relation de Stern-Volmer pour $\alpha_F = 0$).

La figure 5 montre que, dans une très bonne approximation, les signaux de fluorescence obéissent à cette relation 3. Les valeurs de K et de α_F que l'on peut proposer sont, dans ces conditions :

$$K \approx 4,9 \text{ L.M}^{-1}$$

$$\alpha_F \approx 0,11$$

(les données d'absorption peuvent être évidemment soumises au même traitement : on obtient avec une beaucoup moins bonne précision $\alpha_c = 0,94$ où α_c est le rapport des coefficients d'extinction Cq et C).



Notons que la "constante de Stern Volmer", qui est l'inverse du premier membre, dans la relation 3, varie avec la concentration, ainsi que nous l'avions prévu. Dans la figure 5, les points correspondent, de gauche à droite, à des concentrations accrues en iodure (on observe donc que la constante de Stern Volmer tend vers zéro quand Q augmente).

Nous attachons une grande importance à la représentation de la figure 5, dans la mesure où nous avons pu observer sur un très grand nombre de mesures que les points expérimentaux s'alignaient dans cette représentation mieux que dans aucune autre. Ajoutons que lorsque l'on complète la figure 5 par les points obtenus en effectuant des mesures entre 0,01M et 0,1M, on prolonge la droite sans en modifier la pente (c'est à dire que l'on peut caractériser sans doute possible une décroissance de la constante de Stern Volmer avec Q).

Il apparaît donc que c'est la concentration de l'ion I^- , et non son activité qui intervient dans la loi (1), dans la mesure où cette loi correspond à une réalité physique.

CONCLUSION

Nous avons fait l'hypothèse qu'une nouvelle espèce stable, de fluorescence non nulle, coïncidait avec l'introduction d'iodure de potassium dans une solution de rhodamine.

Nous avons étayé cette hypothèse par des observations simples telles que l'évolution du spectre d'absorption, et montré qu'elle rendait compte de l'extinction de fluorescence mieux que ne peut le faire l'hypothèse d'une extinction totale par action de IK sur l'état excité du chromophore. Nous avons montré en particulier que la relation de Stern Volmer n'est pas respectée. Cela tient au fait que le dérivé formé conserve une certaine fluorescence.

On sait qu'il existe de nombreux dérivés iodés des colorants de type xanthénique dont le rendement de fluorescence n'est pas nul (e.g; l'erythrosine).

Notre modèle comporte pourtant plusieurs faiblesses : il suppose que le spectre d'absorption de l'espèce C (donc celui de l'espèce F et celui de l'espèce R) subit un glissement vers le rouge

sans modification appréciable du coefficient d'absorption à 555nm, et sans modification du signal de fluorescence émis par F (signal qui est excité à 545- et l'on peut constater que la variation de densité optique à 545 nm persiste lorsque la fluorescence cesse d'évoluer notablement, c'est à dire lorsque la concentration en IK dépasse 0,8M). Même remarque pour l'espèce Cq.

Autrement dit la faiblesse de notre modèle tient dans les deux observations suivantes : 1°) il n'y a pas de point isobestique lorsque l'on déplace l'équilibre C-Cq (fig 1)

2°) La corrélation entre l'évolution de la fluorescence et celle de la densité optique ne s'applique pas à n'importe quelle longueur d'onde (Fig 3)

En revanche, notre modèle nous a permis de construire une relation simple (relation 3), qui semble bien adaptée aux mesures expérimentales (Fig 5), et qui pourrait être, provisoirement, considérée comme relation empirique; Nous serons donc amenés à étudier, parmi les autres modèles d'extinction, ceux là seulement qui autorisent l'emploi de cette relation.

Cette étude fait l'objet du prochain chapitre.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) J. M. FRANK & S. S. VAVILOV : Zit. F. Physik, 69, 100 (1971)
- 2) E. LUCATU : J. Chim. Phys. 63, 815 (1966)
- 3) G. WEBER : Trans. Far. Soc. 44, 185 (1948)
- 4) A. K. BABKO & A. P. KOSTYSHIMA : Ukr. Khim. Zh. 1969, 544 (CA 71 44. 126)
- 5) N. K. PODBEREZSKAYA, V. A. SUSHKOVA & E. A. SHILENKOV : Issled. Obl. Khim. Fiz. metodov. anal. Miner. Syr'ya, 1971, 87
- 6) A. JABLONSKI : Acta Physica Polonica, 13, 175 (1954)
 " Bull. Acad. Polon. Sci. 5, 513 (1957)
 " Bull. Acad. Polon. Sci. 6, 663 (1958)
- 7) J. GLOWACKI : Acta Physica Polonica, 19, 513 (1960)
- 8) J. GLOWACKI : Acta Physica Polonica, 27, 527 (1965)
- 9) J. HEVESI : in "Molecular luminescence" (an international conference held at Loyola University - August 1968) E. C. LIM, Ed. Benjamin (1969) pp. 167-18
- 10) J. J. BOURGARIT : Thèse Paris, chapitre II
- 11) J. LAVOREL : J. Chim. Phys. 55, 911 (1958)
- 12) E. LUCATU : J. Chim. Phys. 59, 128 (1962)
- 13) E. LUCATU : J. Chim. Phys. 60, 815 (1963)
- 14) E. LUCATU : J. Chim. Phys. 63, 819 (1966)
- 15) J. J. BOURGARIT : Thèse Paris, chapitre IV
- 16) B. S. NEPORENT, N. G. BAKSHIEV & Yu. T. MAZURENKO : "Elementary photo-processes in molecules" NEPORENT Ed. Consultant Bureau N. Y. (1968) pp. 61-82
- 17) J. GREENBAUM : Am. Journ. Pharm. 100, 374 (1928)

CHAPITRE QUATRE

Effet de la température sur l'interaction iodure de potassium

Rhodamine B * ++

L'effet de la variation de température (dans la gamme 15°C-60°C) sur le spectre d'absorption de solutions aqueuses de Rhodamine B contenant IK, ainsi que sur l'intensité d'émission de fluorescence est étudié. Tout se passe comme si deux espèces : Rq et Fq étaient présentes en équilibre stoechiométrique 1/1 dans la solution. Les propriétés de Fq et Rq varient avec la quantité d'iodure ajoutée. Toutes deux sont fluorescentes, en toutes proportions d'IK. Par corrélation avec le comportement des solutions non iodées on déduit que l'équilibre Fq/Rq dépend de la température selon la même loi que l'équilibre F/R. On propose que F et R donnent chacun avec IK des complexes stoechiométriques dont les constantes d'équilibre, identiques pour R et F, ne varient pas avec la température. Ce comportement est identifié au comportement déjà décrit des chromophores fluorescents dans les solvants iodés (External Heavy atom effect).

* résultats présentés à Menton, au premier congrès de chimie quantique
(Juillet 1973)

++ Voir appendices D et I

Dans un précédent chapitre, nous avons abordé l'étude de l'extinction de fluorescence de la Rhodamine B par l'iodure de potassium (IK) ; nous avons montré que ce phénomène n'obéissait pas à la loi de Stern-Volmer, mais que les données expérimentales s'accommodent remarquablement d'une représentation où l'on porte

$$\frac{Q}{I_0 - I} \text{ en fonction de } \frac{Q}{I_0} \quad (\text{où } Q \text{ est la concentration de l'agent}$$

extincteur, I l'intensité de fluorescence—qui diminue lorsque Q augmente—et I_0 l'intensité de fluorescence mesurée en l'absence d'extincteur).

Cette représentation permet d'obtenir une droite. Nous l'appellerons : la représentation 1.

Nous avons observé que le spectre d'absorption du chromophore se déforme lorsque l'on ajoute le sel neutre, mais que cette déformation ne comporte pas de point isobestique. Il semble néanmoins exister une certaine corrélation entre l'évolution du coefficient d'extinction à 555nm, et l'évolution du signal de fluorescence.

Nous nous proposons d'examiner ici les diverses façons d'expliquer ce comportement : Rappelons d'abord que notre première interprétation, fondée sur la nécessité de respecter en outre l'évolution de la polarisation de fluorescence avec Q , peut se résumer ainsi (1).

De même que l'extinction de la fluorescence du chromophore par la température peut être attribuée (2) à un déplacement d'équilibre stoechiométrique de rapport 1/1 entre deux formes (R et F), très semblables en ce qui concerne leur spectre d'absorption, mais fort différentes par leurs propriétés lumineuses, de même l'extinction de la fluorescence par IK peut s'expliquer par le déplacement d'un équilibre entre ces deux formes d'une part, et une troisième d'autre part : la forme Cq. La constante de cet équilibre, stoechiométrique, de rapport 1/1, est KQ , où K ne dépend ni de Q ni de la concentration du chromophore, ce qui semble montrer que l'iodure de potassium forme un complexe 1/1 avec le colorant. Le signal de fluorescence émis par ce complexe est dix fois plus faible que celui du mélange R-F, cependant que son spectre d'absorption est très voisin.

Nous suggérons que la durée de vie de fluorescence de Cq est faible, ce qui explique l'augmentation de la polarisation qui accompagne l'extinction de la fluorescence par IK.

Il existe pourtant une façon simple d'expliquer ce dernier phénomène : c'est que l'action de IK se fait sentir sur les niveaux excités du chromophore, diminuant ainsi la durée de vie de fluorescence d'une façon progressive. C'est l'hypothèse classique (3).

Rappelons que dans cette hypothèse, l'intensité du phénomène d'extinction devrait diminuer lorsque la viscosité augmente (et c'est ce qui a été qualitativement observé (4) dans des conditions –peut-être douteuses– où l'augmentation de viscosité est obtenue par addition de glycérol ou de sucre). Rappelons aussi que, dans la mesure où la durée de vie de fluorescence est indépendante de la température –ce qui est le cas ici– l'élévation de la température devrait accroître l'extinction, accroissement qui traduit précisément la diminution de la viscosité (cette façon de modifier la viscosité est, à notre avis, plus correcte que la précédente). Rappelons que nous avons été conduits à écarter cette hypothèse pour plusieurs raisons, dont l'une est qu'elle ne permet pas d'expliquer la déformation du spectre d'absorption, et l'autre que l'on ne voit pas d'où proviendrait la fluorescence résiduelle, après que le niveau excité ait été dépeuplé par collision avec l'agent extincteur. Nous étudierons néanmoins comment se comporte le système lorsque l'on accroît la température –ce qui nous donnera, comme on le verra, une raison supplémentaire de renoncer définitivement à cette interprétation.

On pourrait imaginer encore une troisième solution : en effet, les deux hypothèses que nous envisagions nécessitent en quelque sorte qu'il y ait mouvement relatif des deux espèces en présence (l'espèce "chromophore" et l'espèce "extincteur"). Il faut qu'il y ait "collision". Or, un modèle a été construit voici quelques décades (5), qui exprime que l'agent extincteur intervient de façon statique ("We thus assume that quenching in solution is not due to collisions of quencher with excited molecules, but rather to "encounters" during which the quencher remains a certain time in a particular" position relative to the chromophore..."). Pour plusieurs raisons, nous considérons l'argumentation de ce théoricien, Jablonski, comme inadéquante : Jablonski distingue un certain nombre de catégories de molécules excitées. Chaque molécule est susceptible de perdre son énergie par retour au niveau fondamental (selon une loi de probabilité classique) plus ou moins vite selon la catégorie à laquelle elle appartient (il existe une catégorie de molécules non perturbées par l'agent extincteur, et d'autres pour lesquelles le retour au fondamental se fait essentiellement par voie non radiative). Chaque molécule excitée est susceptible de changer de catégorie durant le temps

qu'elle reste excitée, changement qui s'opère par le jeu du déplacement aléatoire des molécules d'extincteur.

Jablonski suppose qu'un équilibre statistique s'établit, de ce fait, entre les populations des diverses catégories. Un calcul montre que le temps dont disposent les molécules pour que cette chose se fasse est trop court, surtout dans la limite des très fortes viscosités où, précisément, la théorie est habituellement appliquée... Un examen attentif des diverses reformulations qui en ont été faites (6, 7) montre que l'auteur s'intéressait vraisemblablement aux seuls phénomènes connus aujourd'hui sous le nom de transferts non radiatifs (8). Et c'est peut-être à tort que d'autres auteurs (9, 10) appliquent aujourd'hui son modèle d'extinction à l'action des sels neutres.

Le succès de l'explication de Jablonski tient apparemment au fait que, même en milieu rigide (e.g. solutions très concentrées de sucres), IK entraîne une certaine extinction de la fluorescence des chromophores (Rhodamine, fluorescéine). Il est bien évident que l'existence d'une interaction stoechiométrique explique cela tout aussi bien.

De même qu'il n'est pas facile d'admettre, comme le voudrait cette théorie, qu'une molécule puisse agir à distance sur les transitions d'une autre molécule excitée vers la forme fondamentale (autrement que par transfert de Förster (8)), de même il n'est pas habituellement envisagé que les transitions vers l'état excité soient perturbées à distance. Nous voici donc obligés de chercher pourquoi l'introduction de IK en phase aqueuse modifie le spectre d'absorption de la Rhodamine... Dans les cas où l'on a pu observer simultanément une diminution de fluorescence et une modification du spectre d'absorption, une des principales perturbations est celle de la transition singlet-triplet qui est renforcée lorsque le milieu contient des sels de métaux lourds, des éléments paramagnétiques, des produits iodés (iodure d'éthyle, etc...). Ce renforcement se fait généralement aux dépens de la transition $S_0 \rightarrow S_1$. On appelle ce phénomène "External Heavy atom effect". On propose généralement qu'une complex, de rapport stoechiométrique 1/1 s'effectue entre une molécule de solvant et une molécule de chromophore (12)

L'effet de l'accroissement de la température sur le spectre d'absorption de ce complexe est très faible (13), mais semble traduire une diminution du nombre des complexes formés, de sorte que l'on peut penser à une interaction faible. Nous sommes donc en présence de trois modèles d'interprétation l'un prédit que l'élévation de la température accentue l'intensité de la perturbation, l'autre qu'il la diminue, et le troisième ne précise rien.

Il semble donc nécessaire d'observer l'évolution du spectre d'absorption, et l'évolution de la fluorescence des systèmes quenchés en fonction de la température.

Il n'existe qu'une publication traitant de l'effet de la température sur l'extinction de la fluorescence de la Rhodamine B par IK (10). Il y est montré que la diminution du coefficient de diffusion, résultant de l'augmentation de la température dans un milieu très visqueux (60 % v/v glycérol dans H₂O) peut être tenue pour responsable de la diminution de la grandeur I/I_0 , pour une concentration constante en IK... On peut toutefois concevoir qu'aux concentrations très élevées de colorant (10^{-4} M) où l'auteur opère, la présence d'un dérivé iodé de type Cq soit susceptible de perturber les mesures de plusieurs façons :

- par transfert non radiatif de C sur Cq
- par extinction cinétique de F par Cq (qui est une espèce iodée).

En effet, ces deux processus d'extinction dépendent dans une certaine mesure de la viscosité du milieu (15)... Nous observons au demeurant que les mesures effectuées à température constante font apparaître que la quantité $I_0 - I/I_0$ croît avec Q, (ce qui est incompatible avec nos propres observations, mais s'explique bien si l'on suppose l'existence de telles perturbations.)

ATERIEL ET METHODES

Les mesures de fluorescence, ainsi que la préparation des échantillons de Rhodamine, ont été précédemment décrits (2).

Pour étudier la variation du coefficient d'extinction K (qui se déduit de l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue dans la représentation 1), on a utilisé deux fois douze échantillons contenant les concentrations en Rhodamine 0M, 0,05M et de 0,1M en 0,1M de Q = 0, 1 à Q = 1. Les mêmes échantillons ont servi pour toutes les températures. La précision des données représentées dans le tableau I tient beaucoup, en raison du mode de normalisation des unités de fluorescence, à la précision sur la détermination de F_0 . Dans le cours d'une série de mesures à température constante -qui dure environ huit heures-, on reprend donc plusieurs fois la mesure de F_0 , et on constate généralement une certaine dérive instrumentale. (Il en est de même pour la détermination du zéro, qui est faite avant chaque mesure).

Les mesures de spectres de différence ont été faites sur des cellules en quartz de 10 mm de trajet optique, placées dans des porte-cuves thermostatés. Les mesures en dessous de l'ambiante sont faites en présence d'une paroi froide dans le compartiment de mesure, sur laquelle se condense la vapeur d'eau atmosphérique. La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple immergé dans l'échantillon.

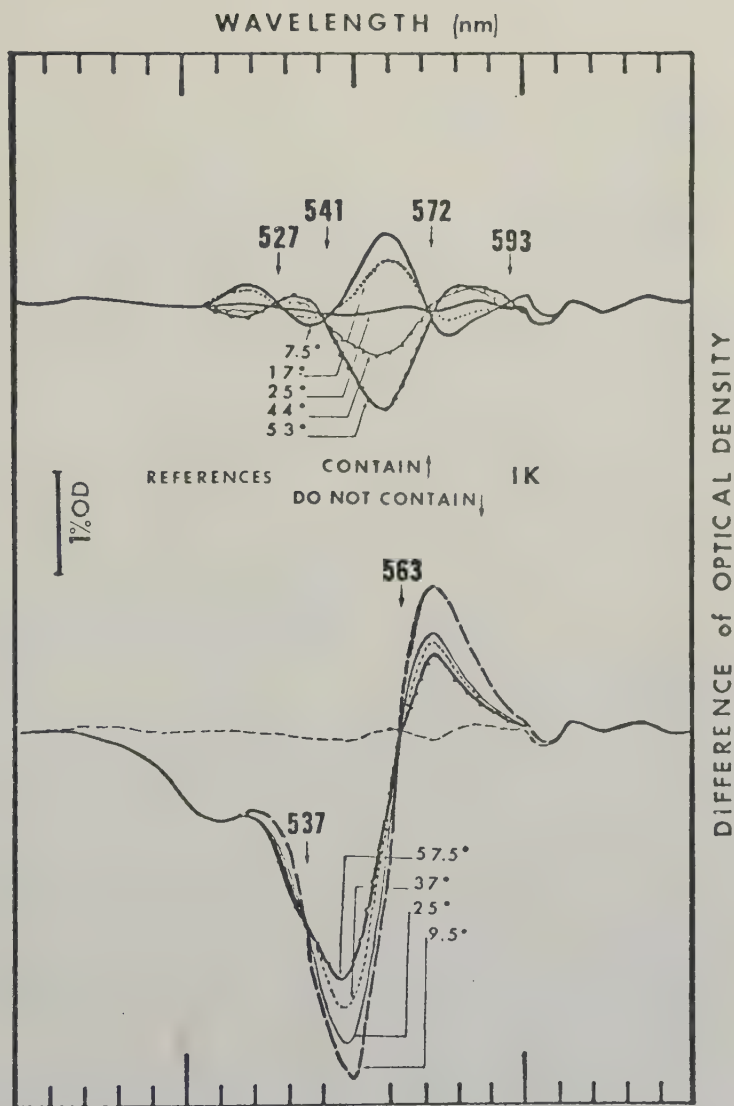


Fig. 1 : Effet de la température et de l'iodure de potassium sur le spectre d'absorption d'un échantillon de Rhodamine B (10^{-6} M) dans NaF 0,1M. Spectrophotomètre Cary 15, résolution 2,5nm. Les spectres figurant en haut de la figure sont obtenus avec deux échantillons de même composition, mais dont l'un est maintenu à température fixe ; 25°C. Les spectres figurant en bas sont obtenus avec des échantillons maintenus à la même température-variable- mais dont l'un contient de l'iodure de potassium, et l'autre pas.

RESULTATS *

1°) Effet de la température sur le spectre d'absorption des solutions quenchées :

Ainsi que nous l'avons observé jusqu'ici, la méthode différentielle se prête bien à l'observation de petites perturbations, aussi c'est celle que nous adoptons ici. Plusieurs séries d'observations ont été faites sur des solutions maintenues à pH basique (pH 10) par addition de NaOH, et contenant des concentrations variables de IK (0, 25M, 0, 5M, 1M, 2M), ces observations conduisant toutes au même résultat que nous présentons, sous une forme "ramassée", dans la figure 1.

Voici comment se réalise une expérience :

a) on part d'une solution de Rhodamine, dont on fait deux aliquotes. Une cuve (A) de spectrophotomètre est alors remplie avec la première fraction, et deux autres (B-C) avec la deuxième, après que l'on ait introduit IK (on notera que l'introduction de IK à l'état solide dans une solution aqueuse entraîne une dilution de cette solution -qui est de l'ordre de 5 % pour une concentration finale de 1M-, de sorte que la concentration de Rhodamine n'est pas égale dans les cuves qui contiennent IK et dans celle qui n'en contient pas).

b Les cuves B et C sont introduites dans l'appareil de mesure, et tandis que la cuve B est maintenue à une température constante, la cuve C est portée à diverses températures. On obtient de la sorte des spectres de différence qui figurent en haut.

Deux points isobestiques apparaissent en toute circonstance, le premier évoluant très faiblement avec la concentration en IK (540-541 nm), et le deuxième de façon plus manifeste, en se déplaçant vers les grandes longueurs d'onde (566-572), le déplacement étant pratiquement nul au-delà de IK 1M.

L'existence de points isobestiques tend à suggérer qu'il n'y a que deux espèces en solution.

c) Pour terminer l'expérience, on remplace la cuve B par la cuve A, et on couple la thermostatisation de la cuve A à celle de la cuve C. On recueille les spectres de différence à plusieurs températures.

On obtient là encore deux points isobestiques (nous ne sommes pas tout à fait sûrs de l'existence de ces points pour la concentration la plus faible 0, 25M car les spectres de différence se distinguent alors très peu).

Nous savons que la cuve A contient elle-même deux espèces en équilibre.
On se convaincra sans peine que cette observation suggère que la constante

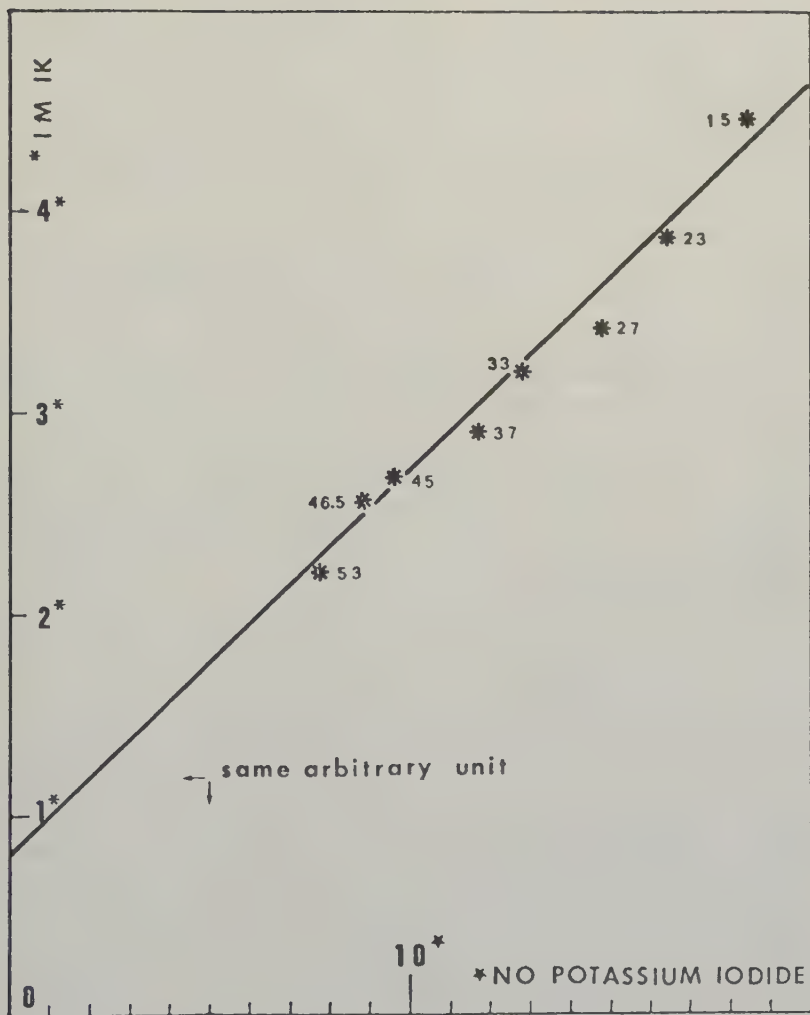


Fig. 2 : Effet de la température sur l'intensité d'émission de fluorescence de solutions non quenchées (abscisses) et quenchées par iodure de potassium 1M (ordonnées). Excitation à 545nm. Concentration en Rhodamine B : 10^{-6} M. Milieu NaF 0, 1M, porté à pH 10 par addition de NaOH. Les températures sont portées en regard des points représentatifs.

d'équilibre entre les espèces présentes dans la cuve A, et la constante d'équilibre entre les deux espèces présentes dans la cuve C sont, en chacune des températures analysées, égales.

2°) Effet de la température sur le signal d'émission de fluorescence :

La figure 2 a été obtenue en mesurant à plusieurs températures les signaux de fluorescence émanant de deux échantillons, dont l'un a la même composition que celui de la cuve A (abscisses) et l'autre la même composition que celui de la cuve C (ordonnées). Qualitativement, cette expérience équivaut, sur le plan de la fluorescence, à celle qu'on a faite avec les mêmes produits, en absorption : elle suggère qu'il existe une corrélation simple entre l'évolution de la fluorescence des solutions quenchées et non quenchées. On observera que l'ensemble des résultats présentés dans les figures 1 et 2 établit le fait expérimental qu'une même corrélation entre l'évolution (I) de la fluorescence et l'évolution (A) de l'absorption à une longueur d'onde quelconque existe, pour des solutions contenant ou ne contenant pas IK (Rappelons que dans ce dernier cas, on obtient une droite en portant I en fonction de A (2)).

Nous avons alors cherché à mesurer si la corrélation qui apparaît dans la fig. 2 était observable à d'autres concentrations en IK. Les résultats, qui sont présentés dans le tableau I, ont été obtenus en deux temps.

Dans un premier temps, on a observé la décroissance de fluorescence d'une solution non quenchée en fonction de la température. Deux types de solutions, de concentration identique en Rhodamine, ont été utilisées pour cela : l'une est NaOH 0,1M, l'autre NaOH 0,1M et NaF 0,1M. Chaque série de résultats (11 points) a été traitée selon la méthode décrite précédemment (2). Les lois de décroissance que l'on obtient ainsi sont sensiblement les mêmes. Le traitement de l'ensemble des résultats conduit à la relation suivante :

$$I_0(T) = Cte.F(T)$$

$$(2) \quad F(T) = \frac{1}{1 + \exp. (12,13 - \frac{3277}{T})}$$

où T est exprimé en degrés K.

Dans un deuxième temps, on a mesuré, à température constante, l'intensité du signal I (T, Q) correspondant à diverses concentrations en IK, et les unités ont été normalisées de telle sorte que $I_0(T)$, mesuré au cours de la même expérience, soit égal à 1000 F (T).

TABLEAU I

TEMPERATURE		15°*	15°	21,75°	26,25°*	29°*	30°	42°	51,5°*	60°	60,5°*
Intensité I (Q, T) ^{††} du signal de fluorescence	0 M	320	320	267	235	217	212	151	116	92	90,7
	0,05M	259	269	224	191	182	171	134	102	85	84,4
	0,1 M	218	224	189	163	155	149	117	94,3	77,5	76
	0,2 M	170	180	151	129	120	118	97,8	75,2	59,6	69,4
	0,3 M	143	155	133	110	106	101	83,5	66,7	53,7	59,2
	0,4 M	132	141	128	96,3	100	91,8	78	61,9	50,1	52,7
	0,5 M	115	124	111	91,4	88,6	83,5	68,1	58,2	45,8	49,6
	0,6 M	110	112	96	82,3	82,8	78,9	66,1	53,9	43	44,9
	0,7 M	91,5	106	89,7	67	77,2	70,6	61,3	46,7	39,6	36,4
	0,8 M	95,2	97,7	84,7	70,6	70,4	67	56,9	47,2	37,3	38,8
	0,9 M	97,6	94	79,7	71,2	69,3	64,6	55,6	49,4	36,8	39,5
	1 M	86,6	80,7	76	64,6	61,3	54,1	47	43,4	32,9	35,9

* Les colonnes marquées d'une étoile correspondent aux mesures faites en présence de NaF 0,1 M

^{††} Les unités de fluorescence sont normalisées de telle sorte que le signal "0 M" corresponde à 1000 fois le pourcentage de l'espèce fluorescente (F), à la température où sont faites les mesures.

TABLEAU II

CONCENTRATION IK	Ecart standard	coefficient de corr.	Pente	signal 0	signal 1000
0,05M	0,016	0,996	0,78 $\pm$ 0,06	12 $\pm$ 14	793 $\pm$ 52
0,1 M	0,010	0,998	0,63 $\pm$ 0,04	19,9 $\pm$ 8,6	646 $\pm$ 32
0,2 M	0,018	0,988	0,48 $\pm$ 0,07	20,5 $\pm$ 15,7	498 $\pm$ 58
0,3M	0,018	0,984	0,41 $\pm$ 0,07	19,3 $\pm$ 15	424,3 $\pm$ 55
0,4 M	0,023	0,97	0,37 $\pm$ 0,09	17,8 $\pm$ 19,5	391 $\pm$ 72
0,5M	0,016	0,982	0,32 $\pm$ 0,06	19,2 $\pm$ 13,4	335 $\pm$ 49
0,6 M	0,009	0,991	0,28 $\pm$ 0,03	19,2 $\pm$ 7,6	303 $\pm$ 28
0,7 M	0,02	0,94	0,26 $\pm$ 0,09	16,3 $\pm$ 19,3	274 $\pm$ 71
0,8 M	0,009	0,989	0,25 $\pm$ 0,04	16,4 $\pm$ 7,7	265 $\pm$ 28
0,9 M	0,010	0,984	0,24 $\pm$ 0,04	17,5 $\pm$ 9	257 $\pm$ 33
1 M	0,012	0,972	0,213 $\pm$ 0,05	15,2 $\pm$ 11	228 $\pm$ 40

* Tous les intervalles de confiance sont donnés à 95 %, pour un nombre de degrés de liberté égal à huit.

Il est intéressant de comparer les résultats de la figure 2 et ceux du tableau I : en présence de IK 1M, nous obtenons, en portant les valeurs $I(T, 1M)$ en fonction de $I_0(T)$ et en effectuant une régression linéaire :

- en milieu NaF 0, 1M une droite de pente 0, 194, d'ordonnée à l'origine (rapportée à $I_0(15^\circ C)$) de 0, 041. L'écart standard sur la régression est de $5. 10^{-5}$, le coefficient de corrélation est 0, 97.

- en milieu NaOH, on obtient une pente 0, 218, une ordonnée à l'origine de 0, 041, un écart standard de $2. 10^{-4}$ et un coefficient de corrélation de 0, 97.

- en milieu NaOH + NaF, une pente 0, 211, une ordonnée à l'origine de 0, 053, un écart standard de $3. 10^{-4}$ et un coefficient de corrélation de 0, 99.

Dans la mesure où ces résultats ne présentent pas de différence significative, nous considérerons que la présence ou l'absence de NaF 0, 1M ne se fait pas ressentir sur l'extinction, et nous traiterons l'ensemble des résultats du tableau I comme s'ils provenaient d'un échantillon unique.

Le tableau II indique, dans ces conditions, les paramètres des onze régressions linéaires obtenues en analysant, ligne par ligne, la corrélation entre $I(T, Q)$ et $I_0(T)$. On remarque que cette corrélation est très bonne, en toutes circonstances. Les ordonnées à l'origine ont été portées dans une colonne dont l'en-tête est zéro, car elles correspondent à la fluorescence du système dans les conditions où, en l'absence de IK, la fluorescence serait nulle. (Un petit calcul montre que c'est au-delà de $100^\circ C$ environ que l'on devrait, si nos extrapolations sont justifiées, observer un accroissement de fluorescence dû à l'addition de IK en faibles proportions (0, 05M)). Sous l'en-tête 1000, nous avons porté les intensités de fluorescence que l'on devrait obtenir à $0^\circ K$ (conditions, rappelons le, où tout le chromophore se trouve sous la forme F).

* Un certain nombre de commentaires ont été joints à la présentation des résultats. Ils sont destinés à alléger la discussion. Les passages de commentaires sont signalés par des " | " portés en marge.

DISCUSSION

Les observations que nous avons présentées doivent être interprétées ainsi :

(A) Tout se passe comme si deux espèces : Rq et Fq étaient présentes en équilibre stoechiométrique 1/1 dans la solution

(B) Tout se passe comme si l'équilibre entre Fq et Rq était gouverné par la même loi que l'équilibre entre R et F

(C) Tout se passe comme si les spectres d'absorption, et les intensités d'émission de fluorescence de Rq et Fq étaient :

1°) Indépendantes de la température

2°) fonction de Q

(D) tout se passe comme si le signal de fluorescence de l'espèce Fq décroissait en fonction de Q (les données figurant dans la dernière colonne du tableau II), et comme si la fluorescence de l'espèce Rq obéissait à une loi plus complexe (avant dernière colonne du tableau II)

La viscosité de la solution diminue, entre 15°C et 60°C de plus de 50%, de sorte que l'un au moins des modèles que nous avons proposé doit être écarté : il reste les deux autres façons d'interpréter l'extinction :

La première est du type "statique" : il faut imaginer que l'iode agit, à distance, sur les molécules du type R et du type F, en perturbant à la fois leurs spectres d'absorption et d'émission (c'est à dire en agissant sur les probabilités de transition) et que cette perturbation est indépendante de la température. Pour les raisons qui ont été dites plus haut, il nous semble que cette interprétation est peu défendable, et nous l'écartons.

La deuxième interprétation est de type "dynamique" : Elle suppose l'existence effective d'un complexe de type Cq. Nous observons en ce cas que l'espèce virtuelle Rq est composée de R et d'une partie de Cq, que nous appellerons Cr, et Fq est composée de F et d'une partie de Cq, que nous appellerons Cf : Voyons maintenant à quelles conditions doit satisfaire ce système pour rendre compte des observations :



- La condition A entraîne que Cr et Cf sont en équilibre stoechiométrique
- La condition B entraîne que l'équilibre entre F et Cf est gouverné par la même loi que l'équilibre entre R et Cr
- La condition C entraîne que les deux lois d'équilibre ci-dessus sont indépendantes de la température
- Le problème se réduit donc à trouver une loi d'équilibre telle que la condition D soit satisfaite . Il y a évidemment une infinité de solutions. De plus les données numériques proposées en D, ayant été obtenues par extrapolation, sont sans doute contestables. . . Nous n'apporterons donc ici que des suggestions sur le type de solution vers lequel on doit s'orienter.

Il avait été envisagé précédemment (1) que IK pouvait interagir stoechiométriquement en deux endroits de la molécule, car on peut obtenir en présence de ce sel un dérivé deux fois iodé (16). Cette interprétation présente l'avantage d'expliquer l'absence de points isobestiques dans l'évolution, à température constante, du spectre d'absorption du chromophore en fonction de la concentration en IK

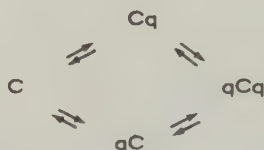
Il a été observé sur des molécules très voisines de la Rhodamine, comme par exemple la fluorescéine, un accroissement de la fluorescence consécutif à l'addition de faibles quantités de IK (17) . Cet accroissement est interprété de diverses manières (relèvement du niveau triplet, interaction entre radicaux libres. . .). On peut penser néanmoins que, en autorisant les transitions radiatives singlet-triplet (Heavy atom effect) l'iode peut amener une molécule non luminescente -comme R- à émettre de la lumière.

Lorsque nous avons, dans le précédent exposé (1) montré la corrélation entre l'évolution de l'intensité de fluorescence et le coefficient d'absorption (tous deux mesurés en fonction de la concentration de IK), nous avons pu remarquer que cette corrélation semblait se limiter aux coefficients du maximum d'absorption (555nm). En effet, et notamment aux plus grandes longueurs d'onde, le coefficient d'absorption augmente régulièrement dans des conditions où la fluorescence devient stable (c'est à dire au delà de 0,8 M IK).

On peut montrer que les résultats traduisant l'équilibre F-Cf sont justiciables d'une seule loi d'équilibre, de stoechiométrie 1/1, dont la constante peut être évaluée à $6,4 \pm 0,5$ (le signal de fluorescence émanant de Cf étant, extrapolable à 116). Tout se passe donc comme si on avait effectivement, au delà de 0,8M, une distribution F-Cf évoluant très faiblement. En raison de la symétrie, l'essentiel des molécules se trouve alors sous la forme Cf -Cr. On peut donc considérer que les perturbations du signal d'absorption survenant au

delà de cette concentration en IK sont dues à des perturbations sur Cf ou sur Cr.

Il y a donc de fortes présomptions pour que l'espèce virtuelle Cq soit doublement complexe, et comporte à la fois des formes monoiodées et des formes polyiodées :



Il semble difficile d'admettre qu'il y ait, dans le cas de la Rhodamine B, des constantes d'équilibre plus grandes que la seule que nous voyons se dégager jusqu'à présent, et qui est voisine de 5.

Des constantes d'extinction beaucoup plus élevées ont été mesurées sur les Rhodamines 3B et 6G (18). D'autres, beaucoup plus faibles (19) sont obtenues avec d'autres sels que IK, comme KCl et KBr. En toute hypothèse, et compte tenu du fait que le système dans son ensemble s'accommode d'une représentation du type 1, il faut que les constantes d'équilibre autres que celle que nous connaissons soient d'un autre ordre de grandeur— et la gamme de concentrations en IK que nous avons explorée jusqu'ici ne nous permet pas d'étudier précisément des équilibres dont la constante serait supérieure à 50, ou inférieure à 0,5

CONCLUSION

Nous avons présenté une série de résultats expérimentaux dont nous n'avons certainement pas exploité toutes les implications. Il semble toutefois que l'on puisse avancer les conclusions suivantes :

- Il est très probable que l'introduction d'iodure de potassium ne modifie en rien les conditions de l'équilibre R-F

- Il est très probable que la perturbation introduite par IK est indépendante de la température

- On doit admettre que IK perturbe simultanément, et d'une façon différente, les deux espèces R et F, et que cette perturbation affecte à la fois l'excitation et l'émission de ces molécules.

Nous avons préféré interpréter ce comportement selon un modèle dynamique, c'est-à-dire en supposant l'existence d'interactions stoechiométriques réversibles sel-colorant, de préférence à un modèle statique (le sel et le colorant ne se "touchent" pas) dont aucun modèle précédemment validé ne justifierait l'existence.

Il apparaît, dans ces conditions que le système nécessite l'intervention de rapports stoechiométriques d'ordre supérieur à un. Ce comportement rappelle le comportement de l'iodure d'éthyle vis à vis des composés aromatiques fluorescents (external Heavy atom-effect).

Nous ne sommes pas en mesure de paramétrer davantage ce modèle trop complexe.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) J. J. BOURGARIT : Thèse, Paris, chapitre III
- 2) J. J. BOURGARIT : Thèse, Paris, chapitre II
- 3) O. STERN & M. VOLMER : Phys. Z. 20 183 (1919)
- 4) J. M. FRANK & S. J. VAVILOV : Z. Physik 69 100 (1931)
- 5) A. JABLONSKI : Acta Physica Polonica 13 175 (1954)
- 6) A. JABLONSKI : Bull. Acad. Polon. Sci. III 5 513 (1957)
- 7) A. JABLONSKI : Bull. Acad. Polon. Sci. III 6 663 (1958)
- 8) T. FORSTER : Z. f. Naturforsch 4a 321 (1940)
- 9) J. GLOWACKI : Acta Physica Polonica 19 513 (1960)
- 10) J. HEVESI in " Molecular luminescence" (an international conference held
at Loyola University-august 1968) E. C. LIM ed Benjamin 1969
- 11) G. C. GIACHINO & D. R. KEARNS : J. Chem. Phys. 52 2964 (1970)
(+ Erratum 54 3248 (1971))
- 12) S. P. Mc GLYNN, T. AZUMI & M. KINOSHITA : "Molecular spectroscopy of
"the triplet state"-prentice Hall 1969 pp 307-318
- 13) V. RAMAKRISHNAN, R. SUNSERI & S. P. Mc GLYNN : J. Chem. Phys. 45
1365 (1966)
- 14) E. LANGE & W. MARTIN : Z. Physik. Chem. A 180 233 (1937)
- 15) J. B. BIRKS : " Photophysics of aromatic molecules " Wiley interscience
London (1970) pp 510-513 & pp 576-580
- 16) J. GREENBAUM : Am. Journ. Pharm. 100 374 (1928)
- 17) W. PRUTZ & K. SOMMERMEYER : Biophysik 4 48 (1967)
- 18) J. GLOWACKI : Acta phys. Polon. 27 527 (1965)
- 19) J. GLOWACKI : Acta Phys. Polon. 25 767 (1964)

CHAPITRE CINQ

QUELQUES CONSIDERATIONS SUR LA LUMINESCENCE

Les modèles d'équilibre qui ont été présentés dans les trois derniers chapitres s'opposent au formalisme des théories quantiques de luminescence, qui veut que le rendement quantique de fluorescence dépende de la température. Tout en soulignant le côté informel de notre point de vue, nous suggérons que ces théories pourraient être révisées. A travers la rhodamine, la question qui se pose est "Pourquoi certains chemins de desexcitation non radiative s'arrêtent au premier niveau excité (règle de Kasha), et pourquoi d'autres s'arrêtent au niveau fondamental. Une corrélation avec la multiplicité des niveaux vibrationnels de faible énergie est envisageable. On montre que d'autres molécules fluorescentes, dont le rendement quantique évolue avec la température, présentent des symptômes de tautomérisme.

En deux endroits de ce manuscrit, une proposition inhabituelle a été formulée (chapitre II et chapitre IV). Ceci concerne le mode de dépendance du rendement quantique de fluorescence avec la température. Il est en effet habituellement admis, et le plus souvent observé, qu'en portant le logarithme de $1/\phi - 1$ en fonction de $1/T$ (où T est la température, et ϕ le rendement quantique de fluorescence), on doit obtenir une droite de pente négative (★)

Il ne sera pas fait de référence, dans ce chapitre. Au demeurant les considérations qui vont suivre ne sont pas destinées à être publiées ailleurs que dans ce mémoire. Si je me décide à les faire figurer ici, c'est parce qu'il me semble nécessaire d'informer le lecteur de la situation paradoxale où nous entraîne, semble-t-il, notre approche expérimentale du problème : En extrapolant très peu nos résultats et l'interprétation qui en a été proposée ici, nous entrons en contradiction de fait avec les théories modernes de la luminescence des molécules dissoutes.

Ces théories, au demeurant, m'échappent presque totalement dans leur formulation, de sorte que je me déclare incompetent pour les critiquer. Voici la raison pour laquelle je ne cours pas le risque de paraître pédant en employant, dans ce chapitre, la première personne du singulier.

PRINCIPAUX OUVRAGES DE REFERENCE

- "Advanced quantum chemistry" H. F. Hammett ; Addison Wesley (1965)
- "Photophysics of aromatic molecules" J. B. Birks ; Wiley N. Y. (1970)
- "Molecular spectroscopy of the triplet state" S. P. McGlynn, T. Azumi, & M. Kinoshita Prentice Hall (1969)
- "Photoluminescence of solutions" C. A. Parker ; Elsevier (1968)
- "Fluorescence" M. M. Guilbault ; Dekker (1967)
- "Luminescence in chemistry" E. J. Bowen ed ; Van Nostrand . London (1968)

J'ai également consulté les articles de revue suivants :

- "Lifetimes in excited states" E. W. Schlag, S. Schneider & S. F. Fischer
In Annual review of physical chemistry 22 1971 pp 465-526
- "Radiationless molecular electronic transitions" B. B. Henry & M. Kasha
In Annual review of physical chemistry 19 1968 pp 161-192
- "Transitions non radiatives dans les molécules" (Thiais, Mai 1969)
N° spécial du journal de Chimie Physique

L'interprétation que l'on donne de cette observation est la suivante :

Dans un laps de temps très court après que la molécule ait été portée dans un état excité (qui est le plus souvent un état vibrationnel excité d'un niveau électronique excité) elle "dégringole" jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas du niveau électronique situé juste au-dessus du niveau fondamental, et de même parité : appelons-le le niveau S_1 .

Séjournant alors sur ce niveau suffisamment longtemps, elle peut perdre le restant d'énergie qu'elle possède soit par rayonnement (fluorescence), soit par passage sur un niveau électronique de parité différente : T_1 ("Intersystem Crossing"). C'est ce dernier transfert qui est sensé requérir une énergie d'activation, et qui justifie la forme de la représentation décrite plus haut.

Le rendement quantique de fluorescence représente le rapport du nombre de quanta de lumière (photons) émis à partir de S_1 au nombre de quanta absorbés. Le rendement quantique de phosphorescence représente le rapport du nombre de quanta transférés sur T_1 au nombre de quanta absorbés.

Les deux hypothèses contenues dans cette interprétation sont explicitées par :

1°) Le fait que le rendement quantique de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation (Loi de Vavilov)

2°) La règle que la luminescence d'une molécule aromatique ne se produit qu'à partir du niveau électronique excité le plus bas pour une multiplicité donnée (règle de Kasha)

3°) L'observation que la somme des rendements quantiques de fluorescence et de phosphorescence est très voisine de 1.

Il est clair, quoique ces règles souffrent de nombreuses exceptions, que la pente de la droite dont il est question représente l'énergie d'activation de la réaction de transfert d'énergie depuis S_1 sur T_1 .

Les images couramment utilisées par les auteurs pour illustrer la nécessité de cette énergie d'activation évoquent pour moi la théorie des cinétiques de réactions homogènes en phase gazeuse (décomposition spontanée d'une molécule poly atomique excitée -cf. S.W. Benson : "the foundation of chemical kinetics" Mc Graw Hill 1960 pp 211-224). Ces images sont celles de "fenêtre" (saddle point), à travers laquelle la molécule doit sauter pour passer d'une configuration quantique à une autre configuration quantique.

D'une façon plus générale, il m'apparaît que les théories proposées excluent presque complètement l'effet de solvant ; elles doivent s'appliquer de la sorte, aussi bien à la fluorescence de molécules gazeuses qu'à celle des milieux rigides ou des solutions. Il s'agit, du moins pour les grosses molécules, de mécanismes strictement intra-moléculaires.

A cette interprétation, on a fait deux objections : on a d'abord fait remarquer que la loi d'Arrhénius, valable pour des systèmes en régime stationnaire, ne devait pas en toute rigueur s'appliquer à ce type de transitions. On a également fait remarquer que, pour que les cinétiques de désactivation non radiative soient compétitives avec les cinétiques radiatives, parfois rapides ($k = 10^9$), il fallait que le facteur de fréquence soit inhabituellement élevé — compte-tenu de l'existence d'un coefficient "énergie d'activation" voisin de 10^{-5} aux températures ordinaires — soit de l'ordre de 10^{14} .

Peut-on proposer une solution de rechange ? Celle que j'ai utilisée dans le chapitre deux, répond évidemment aux deux objections qui viennent d'être faites, puisque :

a) la loi d'Arrhénius s'applique à un équilibre thermodynamique entre molécules non excitées,

b) la constante qui figure dans la relation entre Φ et T traduit une différence d'entropie entre deux "configurations" de la molécule. Cette différence est de l'ordre de 20 u. e., ce qui n'est pas un nombre anormalement élevé (Notons que ce nombre représente aussi le rapport entre les densités d'état de ces deux configurations, dans leur fondamental).

Cette représentation suppose que la température ne joue aucun rôle dans les processus de désactivation : il est certain qu'en phase gazeuse, une telle hypothèse va à l'encontre des nombreuses observations sur l'évolution de la durée de vie avec la température. En est-il de même en solution ? Ne soupçonnant pas les pièges et les difficultés auxquels se heurtent les chercheurs qui mesurent les déclinés de fluorescence, je ne peux pas me prononcer ; il me paraît que ces mesures sont rares et souvent inhomogènes. Pour la phosphorescence, il me paraît difficile de savoir si c'est l'abaissement de température, ou le changement de propriété du milieu (rigidité et constante diélectrique) qui est responsable de l'apparition de désexcitation radiative aux basses températures.

Mon explication ne répond pas au problème essentiel qui est : Pourquoi certaines molécules sont fluorescentes et d'autres non ? Au contraire, elle

le heurte de front : Nous avons deux espèces, l'espèce R et l'espèce F, dont les constitutions sont presque certainement identiques, dont les spectres d'absorption sont très voisins, et dont les rendements quantiques diffèrent, apparemment, de plusieurs ordres de grandeur.

Admettons que le rendement quantique de F soit 1, celui de R : 0. Nous avons là un modèle parfait. Or, qu'observe t'on ?

1°) Le spectre d'absorption de R est, à surface sensiblement égale, plus large que celui de F;

2°) Il y a entre R et F une large différence d'entropie.

Interprétons ces deux observations :

Si les configurations de l'état fondamental et du premier état excité de R présentent par rapport à celles de F de grands changements dans la distribution des états vibrationnels faibles, tels que flexions et torsions des liaisons, on doit obtenir phénoménologiquement l'élargissement du spectre d'absorption, et un notable accroissement d'entropie. La durée de vie de desexcitation radiative, qui se calcule en première approximation à l'aide de la surface du principal pic d'absorption, est sensiblement la même pour R et pour F. On a montré par ailleurs (spectroscopie de flash) que le niveau T_1 n'était pas peuplé, ce qui montre que R n'y transfère pas d'énergie. Donc, si R n'est pas fluorescent, c'est qu'il perd son énergie sans changement de parité (Internal conversion), et cela de façon très rapide. On sait que cette perte d'énergie par "Internal conversion" caractérise précisément le transfert d'énergie depuis les niveaux excités les plus hauts (S_n) vers le niveau S_1 . Il semble donc qu'ici le mécanisme ne s'arrête pas au niveau S_1 , mais au niveau fondamental S_0 .

Certains théoriciens expliquent que la transition S_1S_0 par internal conversion ne se fait pas parce que la différence d'énergie entre ces deux niveaux est trop grande. Cela ne tient manifestement pas, puisque pour R et F c'est la même. D'autres (Kasha, Siebrand) font entrer en ligne de compte les densités d'état, et leur formalisme apparaît ici plus convaincant.

Le véritable problème est donc, à mon sens, l'inverse de celui que l'on pose habituellement : demandons nous, non pas pourquoi R n'est pas fluorescent, mais pourquoi F est fluorescent : (Pourquoi la règle de Kasha ?). C'est une nouvelle question à laquelle je ne suis pas en position de répondre. Je pense que l'on ne devrait pas négliger le fait que :

a) F est beaucoup plus rigide que R, à la fois au niveau S_0 et au niveau S_1 .

TABLEAU I

Quelques observations de thermochromisme sur des
composés fluorescents

NOM	DU COMPOSE	ORIGINE
	RHODAMINE 6G	K & K
	RHODAMINE S	K & K
	FLUORESCEINE SODIUM	M. C. & B.
	EOSINE BLUISH	BAKER laboratory grade
	ERYTHROSINE B	"
	PYRONINE Y	GURR'S microscopical réagent
	ROUGE NEUTRE	"
	ACID FUSCHIN	"
	ACRIDINE RED	"
	SULFATE DE QUININE (*)	K & K
	L-TRYPTOPHANE	KOCH LIGHT Puriss CHR
	D-TYROSINE	"
	L-TYROSINE	"

(*) Il est intéressant de rapprocher cette observation de l'article,
paru en 1969 dans Photochemistry & Photobiology (vol 9) pp 439-444
intitulé " Quinine sulfate as a fluorescence quantum yield standard"
(auteur : Aaron N. Fletcher)

b) En milieu solide (résine polyester), il n'y a pas évolution du rendement quantique avec la température.

c) Les vibrations dont l'absence est significative sont vraisemblablement des vibrations faibles, susceptibles de former un quasi continuum autour de chaque niveau vibrationnel discret.

Il m'a paru raisonnable, toutefois, d'observer dans quelle mesure la solution que nous avons trouvée pour la Rhodamine était extrapolable à d'autres corps fluorescents dont j'aurais pu contrôler que la fluorescence évoluait avec la température.

Tous les produits que j'ai étudiés, ainsi -en tout, une douzaine-, ont un spectre d'absorption qui évolue avec la température, et la plupart présentent des points isobestiques. La liste de ces produits figure dans le tableau I. Il est cependant nécessaire de préciser qu'aucune précaution n'a été prise dans la manipulation de ces produits (critère de pureté, ajustement du pH des solutions, dégazage, etc...) de sorte que les explications autres que celles d'un équilibre du type R-F ne manquent pas. Nous observerons cependant dans les chapitres suivants que, pour deux d'entre eux au moins, cette dernière explication est fortement suggérée par les faits.

Il serait, bien sûr, très important de savoir si nous avons collectionné par hasard quelques unes de ces nombreuses exceptions qui confirment la règle, ou si la règle doit être reconsidérée. Dans ce dernier cas, le champ qui s'offre aux expérimentateurs est très vaste, et je crois, pour ma part, que ce champ devra être exploré avant que les théoriciens ne se prononcent. En tout état de cause, nous ne remettons en cause aucune loi fondamentale, aucun principe de mécanique quantique, mais des théories qui, compte-tenu de la façon dont procède la chimie quantique, s'appuient un peu sur ces principes, et beaucoup sur la généralisation d'observations expérimentales encore peu nombreuses.

CHAPITRE SIX * †

Mise en évidence d'un comportement thermochromique du L tryptophane en solution aqueuse, et corrélation avec l'extinction thermique de la fluorescence.

Résumé

On trouve que le spectre d'absorption d'une solution aqueuse de tryptophane, à pH 5,5, évolue avec la température en respectant des points isobestiques. Les paramètres de l'équilibre ainsi mis en évidence sont déterminés. Si l'on applique ces paramètres aux mesures d'intensité de fluorescence, on trouve que la fluorescence décroît linéairement vers zéro en fonction de la concentration de l'espèce thermotropique (I). La différence d'énergie entre la forme fluorescente (F) et cette dernière espèce est de $7,5 \text{ kcal Mole}^{-1}$. A 30°C , la concentration de ces deux espèces est identique. L'extension de cet équilibre "tautomérique" aux protéines est envisagée.

* Résultats présentés à Menton, au 1er congrès de chimie quantique, Juillet 1973.

† Voir appendice E.

INTRODUCTION

Il est bien connu que la fluorescence du tryptophane décroît lorsque la température augmente. Ce comportement a été décrit comme provenant d'un mécanisme de désactivation unique, opérant sur le niveau excité S_1 , dont l'énergie d'activation serait de 8,3 ou 7,0 kcal.mole⁻¹ selon les auteurs (1,3). On observe, semble-t-il (1), une très faible variation du coefficient d'absorption dans l'ultra violet ; l'effet d'auto extinction se manifestant sur les mesures de fluorescence, à fortes concentrations, est décrit comme variant avec la température (1). Un tel comportement doit faire naître, selon l'opinion du présent auteur, la présomption que deux variétés de chromophore ou plus sont présentes dans la solution, leurs proportions relatives évoluant avec la température, et que l'une d'entre elles, moins fluorescente ou non fluorescente, agit comme filtre optique lorsqu'elle est présente en concentration suffisante. Cela suppose l'existence de plusieurs formes tautomères.

On trouvera dans ce qui suit des résultats expérimentaux qui alimentent cette présomption.

MATERIEL ET METHODES

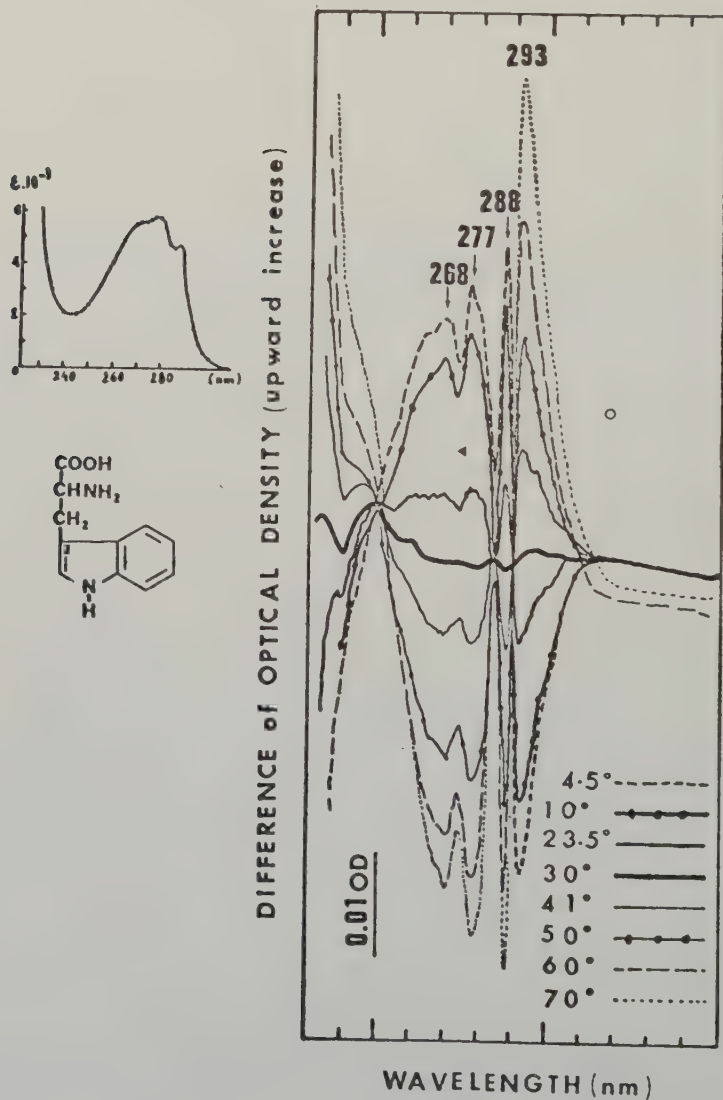
L'échantillon de L tryptophane est fourni par Koch-Light Laboratories (qualité Puriss CHR). Toutes les solutions sont préparées à partir d'eau distillée, ajustées à 0,1 M en fluorure de sodium (Baker "analysed" reagent) et le pH est ajusté à l'aide de soude ou d'acide fluorhydrique (Merck "suprapur") selon le besoin.

Les mesures d'absorption sont faites sur un Cary 15. Les échantillons sont protégés de la lumière ultra-violette entre chaque mesure.

Les mesures de fluorescence sont faites à pH 5,5 - $0,5 \cdot 10^{-5}$ M Trp, sur un fluorimètre double faisceau (Beckman) muni d'un filtre d'excitation interférentiel sélectionnant la raie 254 du mercure, et d'un filtre d'émission Schott UG 11 d'épaisseur 2 mm. Le signal utilisé comme référence est celui d'un échantillon de la même solution, porté à 29°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

On peut constater (fig. 1) que le spectre de différence d'une solution ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M Trp ; pH 6,5, densité optique à 280 : 1,23) évolue avec la température. Trois points isobestiques apparaissent. Dans la mesure où l'absorption des échantillons était trop élevée pour effectuer des observations dans



la région 250-200 nm, on a dilué et observé ainsi deux nouveaux points isobestiques à 223 et 216 nm.

D'un point de vue strictement "spectroscopique", ce comportement montre que deux espèces (que nous appellerons F et I) sont en équilibre thermodynamique, et que la constante d'équilibre dépend de la température (ce qui n'exclut pas la possibilité que F, par exemple, soit en fait un mélange de plusieurs F', F'' etc... dont les constantes d'équilibre mutuelles soient indépendantes de la température) *

Appelons $Y(T_i)$ les valeurs de la différence de densité optique entre l'échantillon à la température T_i et un échantillon de référence, à la température T_0 . Il est possible de déterminer une suite $K(T_i)$ de valeurs de constante d'équilibre, satisfaisant à la loi d'Arrhénius :

$$(1) \quad K(T_i) = k_0 \exp - \frac{\Delta W}{kT}$$

telles que la représentation des $Y(T_i)$ en fonction du paramètre $K/(1+K)$ soit une droite. La méthode qui a été employée ici est une méthode graphique (voir appendice E). Rappelons la signification des paramètres de la relation (1) : ΔW représente la différence d'énergie entre les niveaux électroniques fondamentaux de F et de I, T est la température absolue; k est la constante de Boltzman et k_0 est un paramètre sans dimension, qui du point de vue de la mécanique quantique permet de comparer les densités relatives de l'empilement des niveaux excités des deux molécules au dessus de leurs niveaux fondamentaux respectifs (densité d'états). Quant à la droite dont il vient d'être question, elle exprime que la différence de densité optique mesurée à la température T est une combinaison linéaire de la différence de densité optique mesurable à la température $T = 0^\circ K$ (abscisse zéro de la droite, tout le chromophore est sous la forme F) et de la densité optique mesurable à température infinie (abscisse 1 de la droite, tout le chromophore est sous la forme I), et cela dans une proportion telle que le rapport des formes $|I|/|F|$ vaut $K(T_i)$.

Nous trouvons, avec les données de la figure 1 exploitées pour Y mesuré à 288nm :

$$(2) \quad K_0 = 247000$$

$$(3) \quad \Delta W = 7,5 \text{ kcal/mole}$$

Un des aspects importants de ce résultat tient à ce que, en dépit d'une différence d'énergie relativement grande, la constante d'équilibre reste proche de l'unité (elle vaut exactement 1 à $30^\circ C$). La large différence d'entropie qui compense donc pour l'excès d'enthalpie de la forme I traduit phénoménologiquement le fait que I possède beaucoup plus de niveaux vibrationnels de faible énergie que n'en a F (torsion et flexion des liaisons).

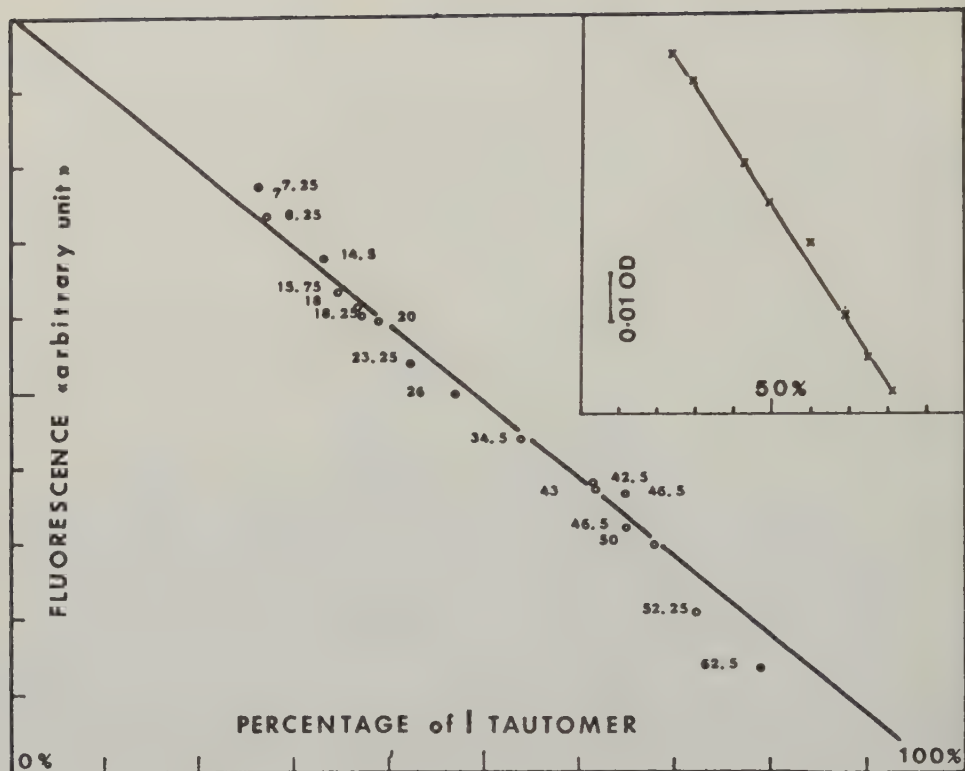


Fig. 2

: On peut observer ici que la fluorescence du tryptophane ($0,5 \cdot 10^{-5} M$, H_2O pH 5,5) décroît linéairement vers zéro cependant que la proportion du tautomère (voir texte) croît de zéro à un. Excitation à 255nm. La température, exprimée en °C, figure en regard des points représentatifs

Nous aborderons les mesures de fluorescence avec le projet de déterminer si l'espèce I, qui paraît donc une espèce peu rigide, est fluorescente.

La figure 2 présente les mesures de fluorescence. Mais les températures ont été traduites en termes de la variable $X = K/(1+K)$ qui représente la proportion de chromophore présent dans la forme I, K étant calculé à partir des relations (1-2-3).

On constate que les points ainsi disposés s'ajustent selon une ligne droite, qui peut être extrapolée à zéro pour $X = 1$; une telle relation suggère fortement que la décroissance de fluorescence est exclusivement provoquée par le déplacement de l'équilibre entre F et I, et que I n'est pas fluorescent.

On retrouve les mêmes valeurs obtenues en 2 et 3 si l'on traite directement les mesures de fluorescence à la façon dont on a traité les mesures de densité optique (c'est ainsi que les résultats présentés dans la référence (1) ont donné par ce traitement un ΔW de 7,0 kcal/mole, ce qui est en légère contradiction avec ceux qui sont publiés dans le même article. Notons que le signal de fluorescence extrapolé à $X=1$ est légèrement négatif.)

Si l'extinction de fluorescence par effet d'élévation de la température est due comme il est proposé ici à un déplacement d'équilibre, cela n'implique pas pour autant qu'il n'y ait pas de transition non radiative à partir des niveaux excités de l'espèce F. Au contraire, l'existence de ces transitions ne fait pas de doute, car si l'on prend pour (pseudo) rendement quantique de fluorescence, à 15°C, une des valeurs les plus sûres (4), qui est de 0,12, on trouve par extrapolation à l'aide des paramètres établis ici que le véritable rendement quantique de F est (en négligeant l'accroissement du coefficient d'absorption) inférieur à 0,2.

Nous proposons donc que le rendement quantique de F ne dépend pas, ou dépend d'une façon négligeable, de la température dans la zone étudiée.

Un deuxième problème consiste à examiner pour quelle raison de structure l'espèce I n'est pas fluorescente : On peut considérer que le nombre de liaisons conjuguées est identique pour I et F, car les spectres d'absorption sont très voisins. Si la molécule est, comme il semble, plus flexible, cela peut tenir à une perte d'aromaticité. La transition de la forme indole vers la forme indolénine (5) est susceptible d'expliquer cela, mais on sait qu'elle est peu probable dans le cas d'un dérivé substitué en position 3. Il reste la possibilité d'une protonation de la molécule, mais ce mécanisme est écarté par plusieurs publications (1, 6-8) sur l'effet du pH; Il n'y a pas de pK de la molécule entre pH 4 et pH 7.

Peut-on avancer que l'espèce I est, en fait, une espèce fluorescente ? Les observations qui vont dans ce sens sont les suivantes : Dans les films solides on détermine, par le tracé du spectre de polarisation de fluorescence, qu'il y a deux transitions électroniques d'excitation dans le principal pic d'absorption (9). Un résultat semblable a été observé par ailleurs, en phase liquide (10). Enfin, à basse température, une "phosphorescence à courte durée de vie" apparaît, possédant le même spectre d'émission que la fluorescence usuelle, cependant que son rendement CROIT avec la température (énergie d'activation 6 kcal/Mole). (11). Deux de ces observations suggèrent que la molécule I retrouve ses propriétés lumineuses en milieu rigide... Mais il n'est pas exclu que I transfère toute son énergie sur F.

En conclusion, nous dirons qu'il semble possible de maintenir notre proposition, selon laquelle deux formes de tryptophane sont présentes dans les solutions aqueuses de ce chromophore. Nous qualifierons provisoirement la loi d'équilibre de "tautomérique" quoique ce qualificatif soit douteux (Nous avons en d'autres circonstances (12) observé un équilibre semblable γ et montré qu'il pourrait s'expliquer par une différence de solvation entre les deux formes de chromophore)⁺⁺.

Nous présentons conjointement (chapitre VII) des résultats préliminaires suggérant que l'acide aminé tyrosine présente un comportement semblable. Les protéines, qui contiennent généralement ces deux chromophores, ont très souvent une fluorescence "intrinsèque", et cette fluorescence décroît lorsque la température augmente (13-16). Une des questions obligatoires sera de savoir si cette décroissance s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption (ce qui est apparemment le cas (17)), et si cette évolution peut être analysée en termes de déplacement d'équilibre du type qui vient d'être décrit.

NOTES

* Nous avons été conduits à éliminer la possibilité de dimérisation : nous n'observons aucune perturbation (en utilisant la même technique de spectroscopie différentielle) lorsque l'échantillon est dilué deux fois. L'expérience a été faite, également, à concentration plus élevée ($10^{-3}M$)

⁺⁺ Nous avons pris connaissance après rédaction de ce chapitre du travail de ALLEY & PURKEY (P.N.A.S. 67 1116 1970) qui indique que la luminescence du noyau indole pourrait être affectée par le degré de solvation .

BIBLIOGRAPHIE

- 1) J. A. GALLY & G. M. EDELMAN : Biochim. Biophys. acta 60 499 (1962)
- 2) J. EISINGER & G. NAVON : J. chem. Phys. 50 2069 (1969)
- 3) J. EISINGER in "Molecular luminescence" E. C. LIM ed Benjamin NY (1969)
pp 185-200
- 4) R. M. GUIRE & I. FELDMAN : Photochem. Photobiol. 18 119 (1973)
- 5) A. W. REMERS in "Heterocyclic compounds" W. J. HOULIHAN Ed Wiley inters.
: Indoles Part One (1972) p 48
- 6) I. WEIRYB & R. STEINER : Biochemistry 7 2488 (19)
- 7) W. B. DE LAUDER & P. WAHL : Biochemistry 9 2750 (1970)
- 8) J. W. BRIDGES & R. T. WILLIAMS : Biochem. J. 107 225 (1968)
- 9) E. A. CHERNITSKII, S. V. KONEV & V. P. BOBROVITCH : Dok. akad. Nauk.
: Bielor. 7 628 (1963) (CA 60 3612g)
- 10) G. WEBER : Biochem. J. 75 335 (1960)
- 11) G. M. BARENBOIN : Biofizika 7 227 (1962) (CA 57 5426i)
- 12) J. J. BOURGARIT : Thèse, Paris chap II
- 13) J. A. GALLY & G. M. EDELMAN : Biopolymer symp. 1 3457 (1964)
- 14) G. E. PERLMAN : Biopolymer symp. 1 383 (1964)
- 15) B. ARRIO, M. HILL & C. PARQUET : Biochimie 55 283 (1973)
- 16) E. A. BURSHEIN, E. S. VEDENKINA & M. N. JUKOVA : Photochem. Photobiol.
: 18 263 (1973)
- 17) J. G. FOSS : Biochim. Biophys. Acta 47 569 (1961)
cf also D. B. WETLAUFER : Adv. in Prot. Chem.
: 17 pp 303-390 (1962)

CHAPITRE SEPT *

Mise en évidence de thermochromisme d'une solution aqueuse de L Tyrosine

Résumé

L'existence de points isobestiques dans le profil d'évolution du spectre de solutions de tyrosine (10^{-3} M, pH 5) montre que deux espèces sont en équilibre thermodynamique. On démontre la corrélation entre ces observations et les mesures d'extinction de fluorescence par la température.

* Voir appendices G et H.

PRESENTATION DES RESULTATS

Une solution 10^{-3} M de L tyrosine (Koch-light : Puriss-CHR) est préparée dans NaF 0,1M (Baker Analyzed) à pH 11, puis ramenée à pH 5 par addition de HF (Merck suprapur).

Des mesures différentielles sont effectuées sur cette solution à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 15 (fig. 1), l'échantillon de référence étant thermostaté à la température de 40°C.

Le spectre d'absorption évolue avec la température : il y a au moins un point isobestique, d'autres étant douteux en raison du manque de résolution instrumentale. (cette résolution est de l'ordre de 0,5nm)

On présente dans le tableau I l'évolution relative des densités optiques à deux longueurs d'onde. Les mesures de Gally et Edelman (1962), effectuées dans des conditions qui nous paraissent comparables, sont également présentées dans ce tableau.

La figure 2 montre qu'une bonne corrélation existe entre l'évolution du signal de fluorescence et celle du spectre d'absorption.

CONCLUSION

Un modèle selon lequel l'extinction thermique de la fluorescence de l'acide aminé tyrosine serait dû au déplacement d'un équilibre tautomérique entre deux espèces possédant des propriétés lumineuses différentes, et des spectres d'absorption très voisins, est concevable.

TEMPERATURE	INTENSITE DE FLUORESCENCE	$\frac{DO}{DO\ 40^\circ}$ à 272,5 nm	$\frac{DO}{DO\ 40^\circ}$ à 286 nm
		résolution 0,6 nm	résolution 0,5 nm
20	100	+0.017	-0.137
30	95	+0.0094	-0.061
40	88	0	0
50	81	-0.007	+0.062
60	74	-0.0157	+0.125
70	67	-0.0229	+0.2

TABLEAU I

Les mesures d'intensité de fluorescence sont celles de Gally & Edelman. Les valeurs de l'évolution relative de l'absorption sont calculées à partir des données de la figure 1, en prenant pour valeurs de densité optique à 40° les valeurs suivantes : 1,36 à 272,5 nm et 0,38 à 286 nm.

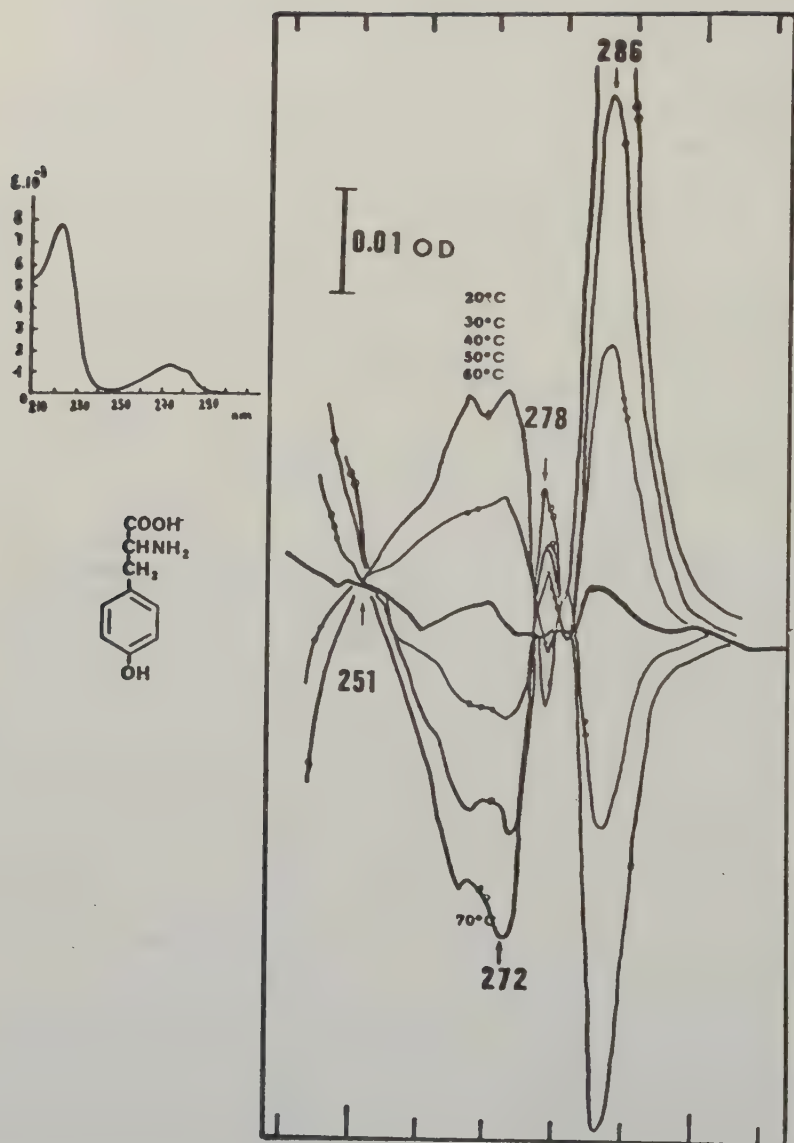


Fig. 1 :
Evolution avec la température du spectre d'absorption de la
L-Tyrosine. Echantillon 10^{-3} M dans NaF 0, 1M, à pH 5.
Spectres différentiels obtenus sur un Cary 15 - la cuve
de référence étant thermostatée à 40°C.

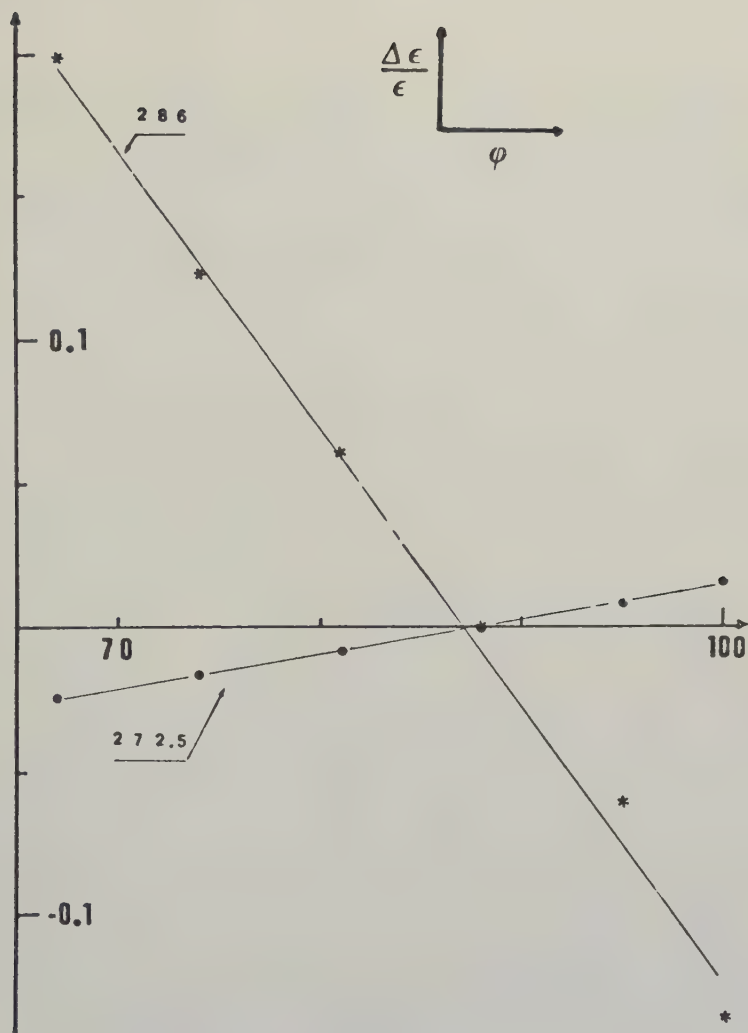


Fig. 2 :

La loi de variation avec la température du coefficient d'extinction d'une part, et de la fluorescence d'autre part permet d'observer pour la L-Tyrosine la même corrélation que pour le L-Tryptophane.

Les données sont celles du tableau I

BIBLIOGRAPHIE

Le travail qui fait référence est celui de Edelman et Gally (1962).
 Nous avons également pris connaissance du travail de J. Feitelson, qui nous semble être actuellement l'auteur qui s'intéresse le plus à ce chromophore.

J. Feitelson : J. Phys. Chem. 68, 391 (1964)

J. Feitelson : Photochem. & Photobiol. 9, 401 (1969)

J. Feitelson & E. Hayon : Photochem. & Photobiol. 17, 265 (1973)

J. Feitelson, E. Hayon & A. Treinin : J. Am. Chem. Soc. 95, 1025 (1973)

J. Feitelson & E. Hayon : J. Phys. Chem. 77, 10 (1973)

I. A. Gally & G. M. Edelman : Biochem. Biophys. Acta 60, 499 (1962)

Pour une revue sur les acides aminés aromatiques :

I. Weiryb & R. F. Steiner in "Excited States of Protein and nucleic acids"
 Mac Mill, 1971, pp. 277-318.

CHAPITRE HUIT

Rôle de l'extinction de fluorescence par l'iodure de potassium
en tant que méthode de sondage des protéines *

RESUME

L'extinction par l'iodure de potassium (IK) de la fluorescence d'un chromophore lié à une protéine présente une complexité particulière dans le cas où le processus d'extinction

1) aboutit à la formation d'un complexe excité de fluorescence non nulle

2) n'est pas contrôlé par la diffusion

3) Fait intervenir un complexe iodé stable

Ces trois circonstances sont réunies pour la Rhodamine B

Cependant, en théorie et en pratique, l'analyse d'une telle situation permet d'obtenir certaines indications sur la nature des interactions qui unissent un chromophore de ce type et une protéine : proportion des molécules qui ne sont pas accessibles par IK, constante d'équilibre entre molécules libres et molécules liées à la protéine.

On étudie le cas de l'interaction non spécifique de la rhodamine avec l'immunoglobuline humaine 7S : les constantes d'interaction de la protéine avec le colorant et son dérivé iodé sont identiques ; le rendement quantique de fluorescence du dérivé iodé augmente fortement lorsqu'il est adsorbé. Toutes les interactions sont réversibles .

* voir appendice I

INTRODUCTION

Lorsque l'on ajoute de l'iodure de potassium à une solution contenant un chromophore fluorescent, une réaction stoechiométrique entre une molécule de chromophore et un ion I^- entraîne l'extinction de la fluorescence. Cette réaction peut intervenir au niveau électronique excité du chromophore, ou au niveau fondamental, ou aux deux.

Du point de vue du signal de fluorescence, tout se passe comme si après l'addition d'IK une partie de l'énergie servant à peupler les niveaux excités était absorbée non par le chromophore C, mais par un dérivé iodé Cq, en équilibre avec lui, et de plus faible luminescence. Puisque la luminescence de Cq diffère de celle de C, on peut déterminer un signal de fluorescence F_0 en l'absence d'ion I^- , ainsi que le signal F obtenu en présence d'une concentration Q d'iodures. On peut enfin supposer qu'un signal F_1 serait obtenu à concentration $Q = \infty$. Le rapport du nombre de molécules présentes (ou virtuellement présentes) sous la forme Cq au nombre de molécules présentes sous la forme C est bien sûr :

$$(1) \quad \frac{|C_q|}{|C|} = \frac{F_0 - F}{F - F_1}$$

Dans tous les cas où la réaction n'intervient qu'à un seul niveau (fondamental ou excité) du chromophore, la relation ainsi déterminée est une fonction linéaire de Q.

Lorsque sont réunies les quatre conditions suivantes :

- 1°) Le signal F_1 est nul
- 2°) La réaction s'effectue à un seul niveau
- 3°) la réaction est contrôlée par la diffusion relative du chromophore et de l'extincteur

4°) il n'y a pas formation de complexes stables (réaction avec l'état excité de la molécule)

(et nous rappellerons que l'on considère généralement la condition N° 4 qui entraîne les trois autres, comme une donnée du problème), alors il est relativement facile de déterminer cette fonction linéaire de Q, de prévoir comment elle peut varier, et donc d'en tirer des conclusions sur l'état dans lequel se trouve le chromophore au moment de la réaction. Plusieurs auteurs ont utilisé cette possibilité pour sonder les macromolécules, et notamment les protéines (1-6). Le tryptophane, la tyrosine, ou des marqueurs extrinsèques sont ainsi soumis à l'action de IK

et l'évolution du signal de fluorescence est exploitée. Un développement théorique de ce procédé a été proposé par Teale et Bradley (4) en appendice d'un article soulignant l'effet d'un autre agent extincteur : l'oxygène. On peut ranger les préoccupations des autres auteurs, qui utilisent IK, en trois catégories :

- Etablir des corrélations entre la masse moléculaire ou la charge d'une protéine X et l'intensité de l'activité IK (1, 2)
- Démontrer qu'une certaine fraction du chromophore est enfouie en quelque sorte dans la protéine (c'est à dire inaccessible à IK) (5)
- Evaluer, en faisant l'hypothèse supplémentaire que tout le chromophore qui reste accessible à IK obéit à une loi d'extinction unique, l'importance respective des deux populations (i. e. combien de tryptophanes enfouis? combien à la surface?) (3, 6)

Nous pensons pouvoir démontrer ici que deux de ces objectifs peuvent être atteints en conservant seulement la condition N° 2, et nous aborderons pour cela le problème sous l'angle théorique, avant de consacrer une partie expérimentale à l'examen d'une interaction de type particulier.

Il s'agit de l'interaction de la Rhodamine B, pour lequel il a été établi que les conditions 1, 3 et 4 ne sont pas respectées, avec une protéine du sérum : l'immunoglobuline G, humaine (7).

Cette démonstration devait être faite, et voici pourquoi : Nous pensons que les preuves que l'on possède, et qui permettent jusqu'à présent de s'assurer qu'un chromophore satisfait aux conditions 1, 3 et 4 sont assez fragiles. C'est ainsi que l'extinction de la Rhodamine était considérée jusqu'ici comme satisfaisant à ces conditions. Qu'en est il des autres chromophores ? On a cru pouvoir montrer que IK réagissait sur le niveau excité du tryptophane (3), mais il semble que l'argumentation est étayée par le fait que la durée de vie de fluorescence du tryptophane diminue avec la température; Or rien n'est moins sûr (8). On peut relever également un certain désaccord entre les observations de Lehrer (3) et celles de Burshtein (6) au sujet de l'évolution du signal de fluorescence du tryptophane avec la concentration en iodure. Selon ce dernier, la relation de Stern-Volmer (conditions 1+2) n'est pas toujours satisfaite. Cette divergence d'observations a été notée également dans le cas de la Rhodamine, et attribuée par nous à l'existence d'un complexe iodé dans la solution (13). Enfin on peut se demander

comment il peut se faire que la constante d'une cinétique contrôlée par la diffusion reste identique dans deux circonstances aussi différentes que le sont : - le cas où le chromophore est libre
- le cas où il est lié en deux points à une chaîne polypeptidique.

Ainsi nous sommes peut être en droit de douter que le tryptophane obéisse aux conditions 3 et 4.

MATERIEL ET METHODES

Les mesures de fluorescence, ainsi que la préparation de la Rhodamine B ont été effectuées comme il a été précédemment décrit (9) (rappelons que les échantillons sont thermostatés, que la fluorescence est excitée à 546nm, que l'instrument de mesure fonctionne en double faisceau).

L'iodure de potassium est un produit commercial (Merck Suprapur) qui n'a pas été repurifié. Les concentrations en IK sont déterminées par le poids sec de IK ajouté à 3ml de solution.

Plusieurs échantillons de gammaglobuline ont été utilisés, provenant de plusieurs sources (Pentex, Hyland). Les résultats quantitatifs présentés ici ont été obtenus sur un échantillon fourni par M. le Dr M. BURSTEIN (centre national de la transfusion sanguine). Chaque échantillon est dialysé extensivement contre une solution 0,1M NaF (Baker Analyzed) à pH 5,6, sur un filtre diaflo XM 100. La pureté est contrôlée par immunoélectrophorèse. De l'antisérum total et de l'antisérum anti albumine humaine sont utilisés séparément afin d'écarter la possibilité que de l'albumine se trouve migrer avec les déterminants IgG_H. On n'obtient pas d'arc de précipitation lorsque l'opération est effectuée dans IK 1M. La masse moléculaire en présence et en l'absence de IK a été déterminée par équilibre sédimentation-diffusion à basse vitesse, et correspond à une distribution homogène avoisinant 150000Dalton.

La titration des iodures libres a été faite en présence de protéine (et en l'absence de colorant) avec une électrode spécifique à cristal (Beckman) couplée à un dispositif d'enregistrement automatique (Radiometer) les solutions contenant la protéine et l'iodure n'ont jamais été utilisées plus de une heure après leur confection.

Les équilibres de dialyse sont réalisés sur des volumes de 5ml, dans des tubes visking, avec lectures échelonnées sur 48 heures. On obtient

après un séjour de 180 heures (protéine + IK 1M) une précipitation par l'antisérum anti IgGH natif, en immunodiffusion sur gel.

ANALYSE FORMELLE DES PROFILS D'EXTINCTION

La loi d'extinction ou mode d'extinction, ou profil d'extinction, de la fluorescence d'un chromophore (par IK ou un autre agent chimique) étant modulable selon le nombre de conditions (1, 2, 3, 4) auxquelles satisfait la réaction d'extinction, et chaque chromophore étant susceptible de satisfaire à une loi différente, on conçoit qu'il n'est pas aisé de présenter un traitement général du cas qui nous intéresse, c'est à dire le cas où une protéine contient (ou interagit avec) un ou plusieurs chromophores.

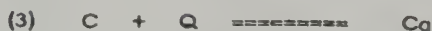
Nous supposons ici que TOUS les chromophores observés dans une même expérience ont un comportement homogène vis à vis de la condition N° 2 (Tous la satisfont, ou aucun), et nous verrons qu'alors la modulation se simplifie comme suit :

a) Cas où il y a une seule espèce de chromophore et un seul mode d'extinction.

Alors "l'équilibre virtuel" qui nous a conduit à établir la relation 1 est une fonction linéaire : KQ de la concentration de l'agent extincteur. Si l'on écrit que $F_1 = \alpha F_0$, il vient :

$$(2) \quad \frac{FQ}{F_0 - F} = \alpha \frac{F_0 Q}{F_0 - F} + \frac{1}{K}$$

- dans le cas où I^- agit au niveau fondamental, K représente la constante d'équilibre de la réaction



- dans le cas où I^- intervient dans l'état excité de la molécule, K représente la constante de Stern Volmer (10), du moins dans l'hypothèse où α est nul (rappelons que dans la représentation de Stern-Volmer on fait figurer la variation de $1/F$ en fonction de Q = il est évident que cette représentation n'est plus rectiligne si α est différent de zéro, ce qui montre qu'une représentation non linéaire n'est pas nécessairement l'indication de la présence de plusieurs variétés de chromophores comme on semble le croire, souvent).

b) Cas où il y a une seule espèce de chromophore, et où l'iodure réagit à la fois avec le niveau excité et le niveau fondamental

La "constante d'équilibre" définie par la relation (1) est égale à

$$(4) \quad kQ + KQ + kKQ^2, \text{ où } kQ \text{ et } KQ \text{ sont les deux constantes que l'on obtiendrait respectivement s'il n'y avait pas de réaction au niveau fondamental, ou pas de réaction au niveau excité. (Ce calcul a été fait en conservant l'hypothèse de Vaughan et Weber (11), selon laquelle le complexe excité } Cq^* \text{ est obtenu à la fois par excitation de } Cq \text{ et par réaction de } C^* \text{ avec } IK).$$

La représentation définie par la relation (2) devient

$$(5) \quad \frac{FQ}{F_0 - F} = \alpha \frac{F_0 Q}{F_0 - F} + \frac{1}{K + k + kKQ}$$

Observons que dans le cas où $\alpha = 0$ la quantité $\Delta F/QF$ est une fonction linéaire de Q .

En portant $FQ/\Delta F$ en fonction de $F_0 Q/\Delta F$ on n'obtient pas, comme précédemment, une droite, mais une courbe à la concavité tournée vers le haut.

c) Cas où il y a plus d'une espèce de chromophore

Nous nous limiterons le plus souvent au cas où il y a deux espèces, et nous distinguerons selon que les proportions respectives des espèces en présence sont modifiées ou non par l'addition de IK .

1er cas : Il n'y a pas de modification des proportions (Fig 1a)

Il en sera toujours ainsi si l'agent extincteur intervient seulement sur les molécules portées au niveau excité. Dans le cas contraire il faut que les espèces ne soient pas en équilibre les unes avec les autres

-Une seule situation conduit à une relation simple, linéarisable : c'est celle où l'un des chromophores, que nous appellerons C_p , n'est pas accessible, et où l'autre obéit à la loi (2). On se convaincra sans peine que l'addition de l'extincteur déplace dans ce cas un "équilibre stoechiométrique" dont les positions extrêmes sont respectivement le cas où il n'y a que des chromophores de type C et C_p , et le cas où il n'y a que des chromophores de type Cq et C_p . La constante d'équilibre, définie par la relation (1), est la constante d'équilibre entre C et Cq . En portant $FQ/\Delta F$ en fonction de $F_0 Q/\Delta F$ on obtiendra donc une

droite de pente α_p . Si l'on dispose par ailleurs du moyen de mesurer le quotient du signal émanant de C_q au signal émanant de C (quotient que nous avons précédemment appelé α), alors il devient possible de savoir quelle fraction β du signal FQ est imputable à l'espèce C_p :

$$(6) \quad \beta = \frac{\alpha_p - \alpha}{1 - \alpha_p}$$

- toutes les autres situations sont plus complexes, et difficilement exploitables : il nous est arrivé cependant de traiter le cas d'un mélange de deux chromophores obéissant strictement à la loi de Stern-Volmer selon la relation :

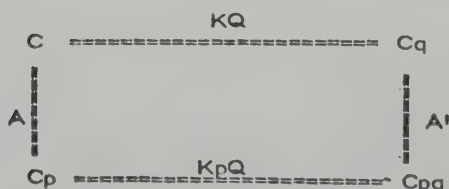
$$(7) \quad \frac{\Delta F}{FQ} = \frac{\beta K_p + K + K K_p Q}{1 + (K_p \beta K) Q}$$

Dans laquelle K et K_p sont les constantes de Stern-Volmer de ces deux chromophores C et C_p . (On a donné à β la même valeur qu'en 6). C'est l'équation d'une hyperbole équilatère, et les trois inconnues K , K_p et β ont été déterminées à l'aide d'un ordinateur. On pourrait également utiliser les dérivées des représentations de $\Delta F/FQ$ en fonction de Q - que nous appellerons $Y(Q)$ et de $\Delta F/F$ en fonction de Q (que nous appellerons $X(Q)$), et utiliser la relation

$$\frac{Y}{X} = K K_p X^{-1} - \frac{K_p + \beta K}{1 + \beta}$$

2ème cas : Les proportions de C et C_p sont modifiées par l'addition de IK

Cette situation peut être schématiquement décrite comme suit :



Ce modèle n'est complexe qu'en apparence : en fait tout se passe comme si l'addition d'iodure déplaçait un équilibre entre deux formes

extrêmes, l'une étant le mélange C, Cp, et l'autre le mélange Cq, Cpq (Fig 1 b). Si la condition 2 est satisfaite, ce qui signifie que l'iode opère seulement sur le niveau fondamental, alors la relation 2 est applicable, de sorte que l'analyse du profil d'extinction de fluorescence ne permet de déduire que deux paramètres sur les six qui entrent en jeu : trois constantes d'équilibre, et trois rapports d'intensité de signal de fluorescence.

Si β' est le rapport des intensités de fluorescence émises par les espèces Cpq et Cq, on montre que la relation 2 s'écrit :

$$\frac{QF}{\Delta F} = \alpha' \frac{QF_e}{\Delta F_e} + K'^{-1}$$

$$\text{où } K' = K \frac{1 + A'}{1 + A} \quad (8) \quad (K, A \text{ et } A' \text{ ctes d'équilibre})$$

$$\alpha' = \alpha \frac{1 + \beta'}{1 + \beta} \quad (9)$$

La démonstration est généralisable au cas où il y a n espèces en équilibre stoechiométrique, et où I^- ne donne avec chacune d'entre elles que des complexes stables. Il est évident au demeurant que si, outre ces espèces en équilibre, existent une ou plusieurs autres espèces de chromophore qui ne sont pas atteintes par l'ion I^- les considérations qui ont abouti à la relation 6 demeurent valables, ainsi par conséquent que la relation 2.

Nous ne sommes pas en mesure de proposer une solution simple du cas où l'iode réagit à la fois sur les niveaux fondamentaux et sur les niveaux excités d'une population de chromophores en équilibre.

Nous dirons, pour résumer cette partie théorique que

1°) dans tous les cas où une seule espèce de chromophore est accessible à l'agent extincteur, une seule fois

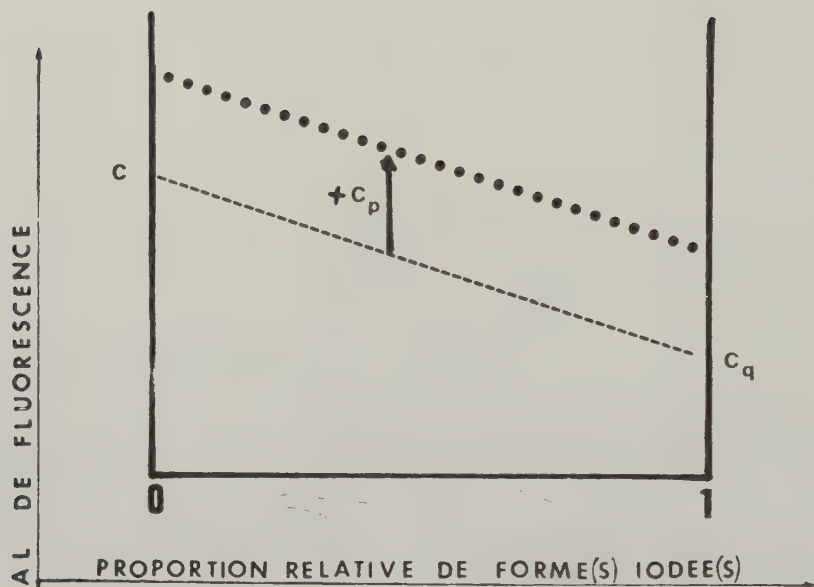
2°) dans tous les cas où les espèces accessibles à I^- sont en équilibre stoechiométrique les unes avec les autres, et où I^- ne réagit qu'avec leur fondamental

Le profil d'extinction obéit à une loi simple, gouvernée par deux paramètres. Autrement dit tout se passe comme si il n'y avait qu'un seul chromophore dans la solution.

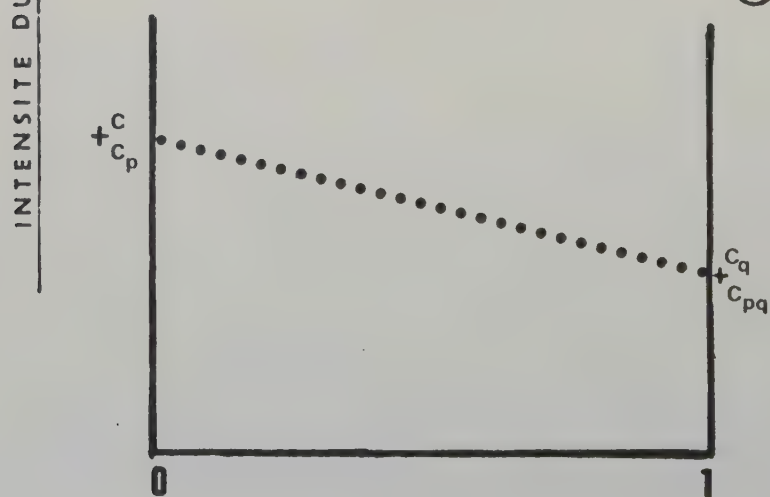
Donc si l'on compare les profils d'extinction obtenus en présence et en l'absence de protéine, et si l'on obtient dans les deux cas une telle

FIG. 1 : Voir texte

(a)



(b)



loi simple il sera impossible de distinguer si la perturbation introduite par la macromolécule résulte de la création de plusieurs espèces de chromophore, ou d'une modification des propriétés de ce chromophore. Il convient de remarquer que l'examen des éventualités possibles est facilité si l'on peut déterminer pour chaque valeur Q la pseudo-constante d'équilibre définie par la relation 1 : cela nécessite que l'on connaisse F_1 , donc que l'on puisse étudier le signal aux fortes concentrations en IK

SULTATS

Les résultats qui seront présentés ici ne diffèrent pas qualitativement de ceux que l'on peut obtenir avec des molécules d'anticorps provenant de source différentes : toutes les immunoglobulines 7S qui ont été testées (chèvre, lapin, homme) se conduisent de la façon suivante lorsqu'on les introduit dans une solution de Rhodamine B :

- L'addition de protéine à une solution contenant du colorant et pas de IK perturbe faiblement le signal (Tableau)

- L'addition de protéine à une solution contenant, en outre, IK perturbe également le signal, mais dans un sens différent selon la concentration initiale de IK (Tableau)

- Il n'y a pas, dans la limite de précision de nos mesures spectrophotométriques, d'évolution du spectre d'absorption. La position du maximum d'absorption ne change pas.

- Le spectre d'émission, en présence de IK.1M, évolue d'une façon qui ressemble à une transformation homothétique du spectre d'émission en l'absence de IK par rapport à la ligne de base (fig 2)

- L'extinction de la fluorescence par addition de IK obéit, en présence ou en l'absence de protéine, à une loi simple. La réduction linéaire qui en est présentée (fig 3, médaillon) témoigne néanmoins que les mesures ne sont pas superposables.

- Les mesures d'équilibre de dialyse montrent que la quantité de colorant retenue par la protéine reste sensiblement égale, en présence ou en l'absence de IK, pour une même concentration P de protéine. Les déterminations de concentration sont effectuées par mesure de la densité optique des solutions à 555nm : rappelons que les coefficients d'extinction de la rhodamine et de son dérivé iodé sont sensiblement égaux.

- Le dosage de l'iode libre en fonction de la quantité d'iodure ajouté montre que ces quantités sont proportionnelles sur une large gamme de concentration (fig 4).

TABLEAU I

EFFET DE L'ADDITION DE QUANTITES CROISSANTES D'IMMUNOGLOBULINE
SUR LA FLUORESCENCE DE LA RHODAMINE B *

concentration en protéine (%)	Milieu sans IK	Milieu 0,025M IK	Milieu 1M IK
0	1000	897	256
0,053	958	867	284
0,1	941	862	299
0,148	931	859	307
0,192	920	847	317
0,233	914	844	319
0,272	914	835	325
0,308	894	831	328
0,343	883	829	329
0,376	881,5	823	332
0,408	-	817	332

* Les mesures sont faites sur un fluorimètre BECKMAN . Température 22°C, excitation 545 nm. Milieu : eau + NaF 0,1M, pH 9,2 . Toutes les mesures ont été normalisées de telle sorte que la fluorescence de l'échantillon (10^{-6} M) soit égale à 1000, en l'absence de toute perturbation.

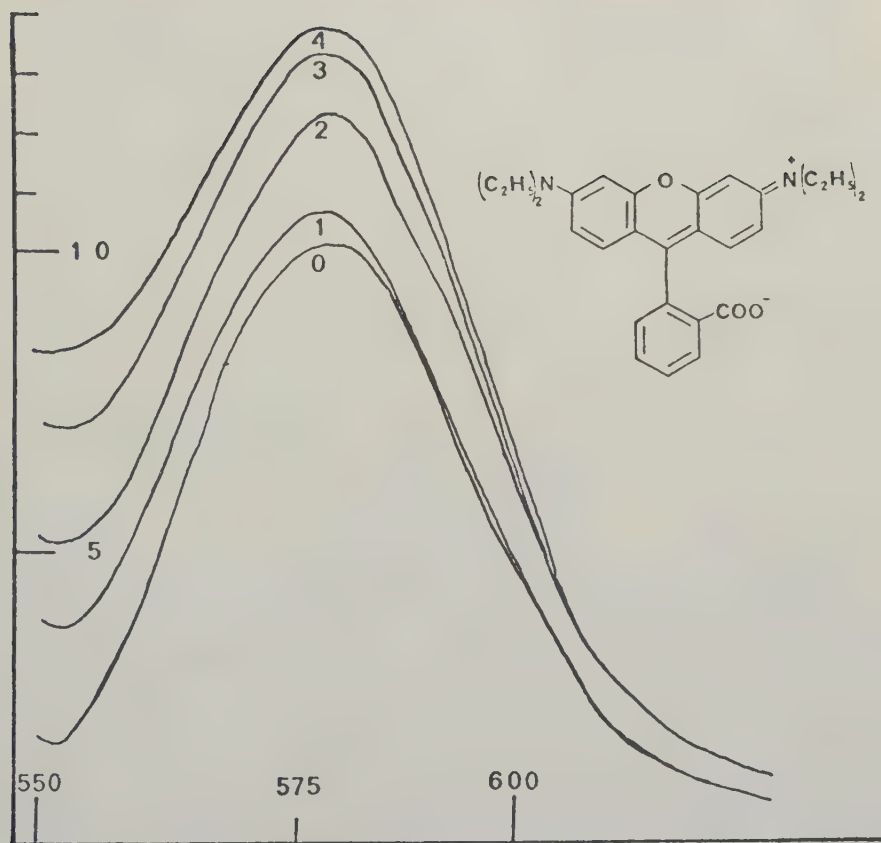


Fig. 2 Effet de l'addition de la protéine IgG sur la fluorescence de la rhodamine B. Les spectres d'émission (non corrigés) ont été enregistrés à 23,5°C. Excitation 550nm. Résolution 10nm. Spectrophotomètre JOBIN & YVON. Le colorant (10^{-6} M) est dissout dans de l'eau non tamponnée, en présence de 1K 1M. La quantité de protéine, en gramme % est de 0%(0) - 0,09%(1) - 0,27%(2) - 0,4%(3) - 0,5%(4).

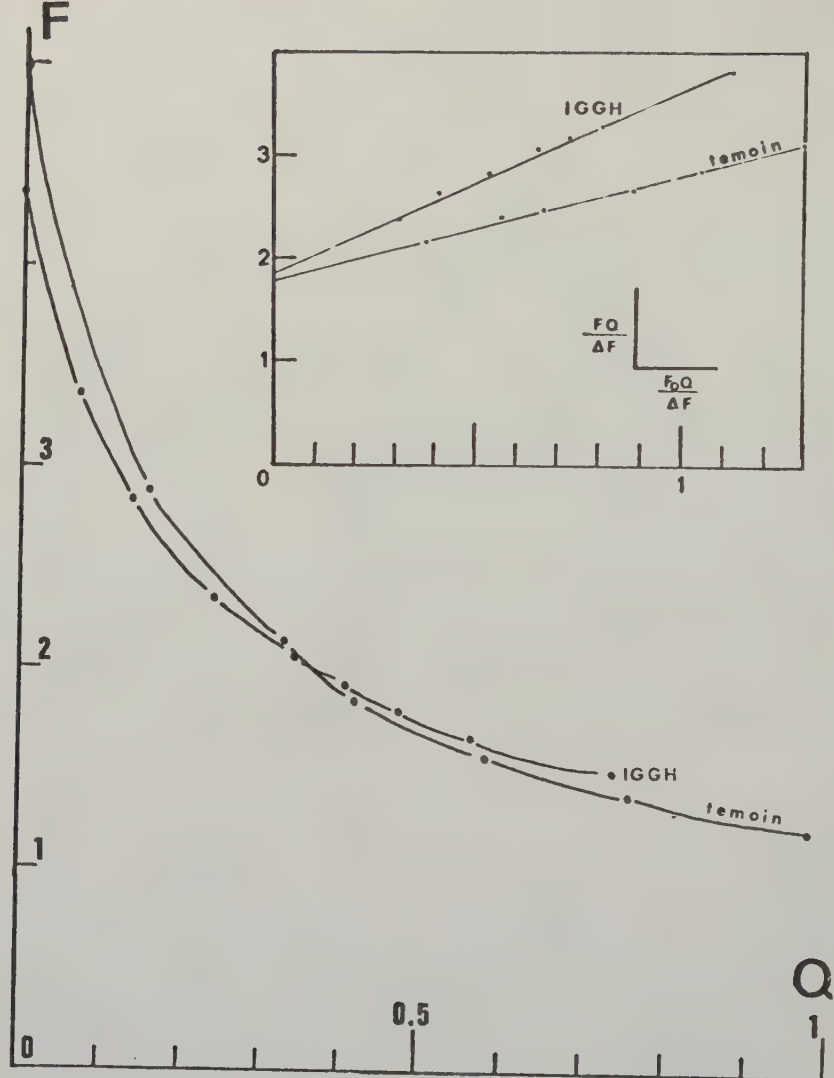


Fig. 3 Effet de l'addition de IK sur la fluorescence de la rhodamine B.
 Le signal (unités arbitraires) est enregistré à 19,5° (pH 8,5- NaF 0,1M),
 en fonction de la concentration Q d'iode de potassium (Mole. L⁻¹).
 TEMOIN : Rhod. 10⁻⁶M. IGGH : Rhod 10⁻⁶M + Immunoglobuline 0,42%

Medaillon diagramme représentatif (voir texte) : On obtient, par régression
 linéaire, les valeurs suivantes : TEMOIN = K = 6,1 α = 0,056
 IGGH = K = 5,2 α' = 0,171

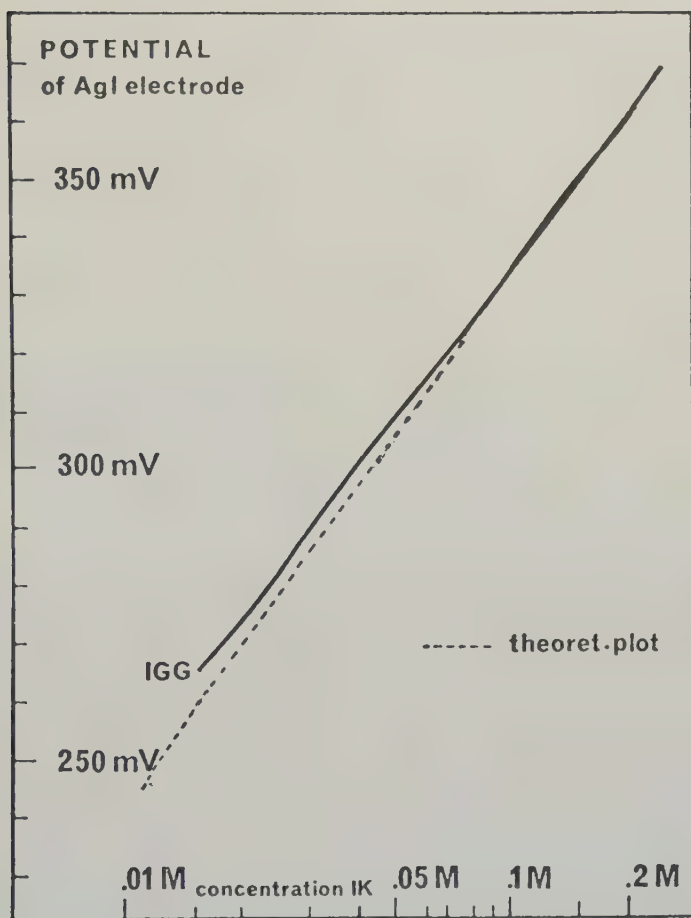


Fig. 4 Dosage électrométrique de l'ion I^- . Milieu NaF 0,1M-pH 8,5-IGGH 0,1%
La concentration portée en abscisse est celle de IK total.
En pointillé : calibration de l'électrode présentée par le fabricant.

DISCUSSION

On sait que l'iodure de potassium réagit sur la rhodamine, qui elle même est composée de deux espèces en équilibre (12), pour donner d'autres espèces fluorescentes (13), en équilibre avec les premières. Les résultats de la figure 2 et du tableau I suggèrent que la protéine se conduit, vis à vis de ce mélange de chromophores en équilibre, comme un agent extincteur (ou exaltateur) de fluorescence, et nous avons essayé en conséquence de traiter le phénomène comme un cas d'extinction par addition d'agent extincteur (en proportion P).

-La figure 5, qui résulte de cette tentative, montre que nous sommes en droit d'estimer que la loi à laquelle obéit cette perturbation est une loi simple.

-On sait d'autre part, par les mesures d'équilibre de dialyse, que la protéine forme un complexe avec une fraction du colorant.

-On sait enfin (fig 3) que l'extinction par IK, alors que ce complexe existe, conserve sa représentation simple.

Donc nous proposerons la solution suivante :

-Il existe une interaction réversible entre une ou plusieurs des espèces de chromophores présentes et la protéine. (S'il y a plusieurs espèces qui interagissent avec la protéine nous pouvons toujours, dans la mesure où elles sont en équilibre, les identifier à une seule espèce virtuelle)

-Si C est le chromophore, et C_p l'espèce attachée sur la protéine : on a

$$\frac{|C_p|}{|C|} = K \cdot |P|$$

(ce qui n'est possible que si le nombre de sites libres sur la protéine reste toujours très grand devant le nombre de sites liés).

- Les constantes A et A', utilisées dans la relation (8) sont égales (faute de quoi les droites présentées dans la figure 3 n'auraient pas une origine commune), de sorte que l'on peut écrire

$$A = A' = KP \quad (\text{où } K \approx 6 \pm 1 \text{ si } P \text{ est exprimé en } \%)$$

-Il y a donc, outre l'espèce C_p , une espèce de type C_{pq} , c'est à dire que la protéine fixe non seulement le chromophore, mais son dérivé iodé. Et l'on peut calculer, en s'aidant de la relation 9, qu'il y a un rapport voisin de 3,5 entre la fluorescence nominale de cette nouvelle espèce, et celle de C_q . (Nous trouvons, pour $KP \approx 3$, que β' est voisin de 4,6)

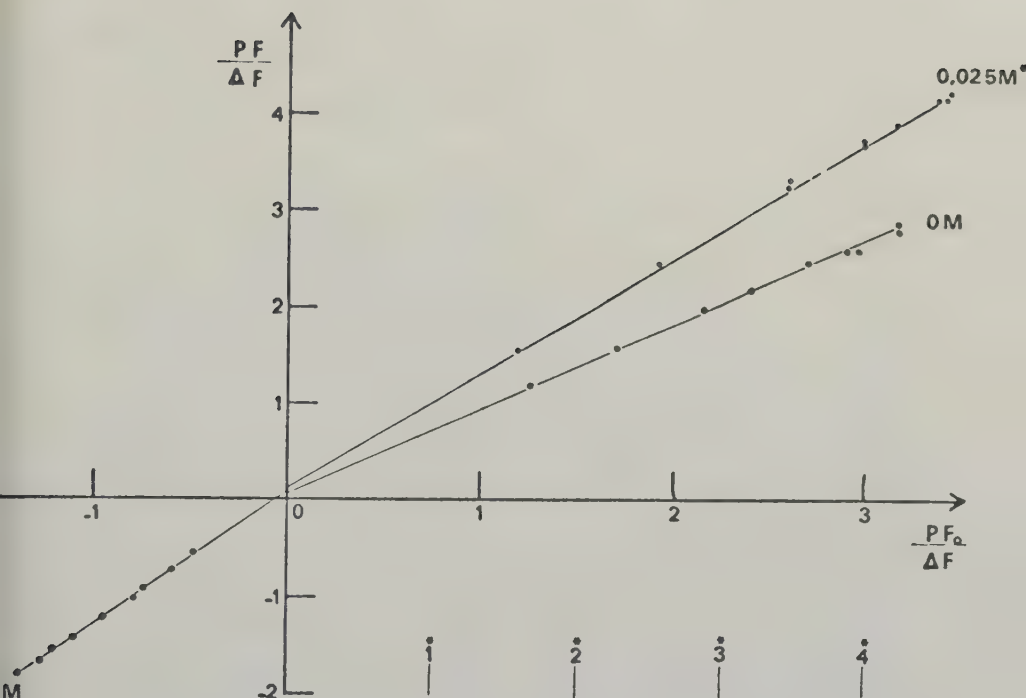


fig. 5 Traitement des données du tableau I - l'hypothèse est que la protéine se comporte vis à vis du chromophore comme un agent extincteur : Le diagramme représentatif est linéaire, suggérant donc l'existence d'une interaction réversible. On obtient, par régression linéaire, les valeurs suivantes :

milieu IK 0M	: $K = 6,37$ $\beta = 0,85$
milieu IK 0,025M	: $K = 5,35$ $\beta_p = 0,883$
milieu IK 1M	: $K = 7,86$ $\beta_p^i = 1,39$

Nous sommes ici dans un cas apparemment typique, où l'interaction protéine chromophore est connue (7). Notre interprétation diffère des interprétations usuelles dans la mesure où nous attribuons l'exaltation de fluorescence (en milieu IK) non pas à l'existence d'une fraction inaccessible à l'iode, mais au contraire au fait que le colorant reste accessible alors qu'il est attaché à la protéine, mais possède une fluorescence supérieure à celle qu'il possède lorsqu'il est libre.

Est il possible de proposer d'autres interprétations ?

Tous nos résultats sont interprétables en supposant que nos données de départ sont fausses, c'est à dire que l'extinction par IK est du type cinétique. Mais l'interprétation conduit à admettre que le colorant peut "s'infiltrer" dans la protéine en des endroits que l'iode ne peut pas atteindre. Ceci n'est pas exclu puisque la rhodamine peut pénétrer là où l'eau ne pénètre pas... Mais nous conduit néanmoins à une impasse puisque, à l'inverse de certains marqueurs de fluorescence, ce produit se décolore en milieu non polaire. L'exaltation de fluorescence ne peut provenir non plus d'un encombrement stérique qui limiterait l'efficacité des collisions $C + Q$ car la représentation du phénomène cesserait d'être linéarisable (fig 3).

Pour la même raison, on doit écarter la possibilité que la protéine réagisse directement avec les états excités du chromophore, par voie cinétique.

Enfin nous avons conçu, et rejeté, l'hypothèse que la protéine pourrait fixer de façon irréversible le colorant, de telle sorte que l'iode ne trouve plus de site pour réagir avec ce dernier. Cette hypothèse est en contradiction avec le mode de variation du signal présenté sur la figure 5.

On remarquera donc que la mise en évidence directe de l'interaction par dialyse à l'équilibre ne nous a pas servi : nos mesures de fluorescence étaient suffisantes pour conclure à l'existence d'une interaction réversible ; certaines de ces mesures étaient elles même inutiles, comme l'étude directe de l'extinction par IK en présence et en l'absence de protéine. On peut remarquer cependant que l'effet de l'addition de protéine à du chromophore non iodé perturbe faiblement le signal, de sorte que la constante d'équilibre est difficile à évaluer. La précision est bien meilleure en milieu IK.

CONCLUSION

L'analyse que nous avons présentée ici est en quelque sorte l'analyse d'une "perturbation au second degré" :

En effet l'addition de IK à une solution fluorescente d'un chromophore entraîne une perturbation de cette fluorescence : et nous avons tenté de décrire cette perturbation à l'aide d'un nombre mesuré de paramètres mesurables. Mais nous nous sommes surtout intéressés à la façon d'interpréter la "perturbation de perturbation" qui survient, ainsi qu'on a pu souvent l'observer, lorsque le chromophore se trouve inclus dans (ou attaché à) une macromolécule.

Il est apparu que la représentation de la fonction paramétrique

$$Y(Q) = \frac{F \cdot Q}{F_0 - F}$$

$$X(Q) = \frac{F_0 \cdot Q}{F_0 - F}$$

où F et F_0 représentent les intensités de fluorescence mesurées respectivement lorsque l'agent extincteur est présent, à la concentration Q , et lorsqu'il est absent, conduisait, dans la plupart des cas envisagés, à une relation de type $Y = aX + b$.

En appliquant cette représentation à des mesures faites sur la Rhodamine B, dans des solutions contenant IgGH, nous avons constaté que la relation linéaire était maintenue et nous avons conclu que l'interaction chromophore protéine ressortait d'un processus d'adsorption. On a pu constater que le complexe Cq (dérivé iodé de la Rhodamine) était également adsorbé sur la protéine, et que cette adsorption avait pour effet d'augmenter considérablement la fluorescence de ce dérivé.

Considérant que d'autres chromophores (notamment le tryptophane) pourraient avoir le même comportement - et ceci sans préjuger du fait que la réaction IK-chromophore se produise dans l'état excité ou dans l'état fondamental de ce dernier - il nous semble important de déterminer la raison de cet accroissement de fluorescence. En toute hypothèse la méthode de perturbation de fluorescence par IK ne nous semble pas se présenter comme une méthode permettant à elle seule de dégager clairement l'existence de "zones interdites" dans une macromolécule.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) C. VERNOTTE : C. R. Paris 264 D 1892 (1967)
- 2) B. ARRIO, F. ROCHER, C. BOISSON & C. VERNOTTE : B. B. R. C. 39 589 (1970)
- 3) S. LEHRER : Biochemistry 10 3254 (1971)
- 4) F. W. TEALE & R. A. BRADLEY : Biochem. J. 116 341 (1970)
- 5) M. H. WINKLER : Biochemistry 8 520 (1968)
- 6) E. A. BURSHTEN : Biophysics 13 520 (1968)
- 7) O. P. ROITMAN, L. A. CHMUTINA : Khim. Khim. Teknol. 1970 91 (C. A. 76 31427t)
- 8) J. J. BOURGARIT : Thèse, Paris, chapitre VI
- 9) J. J. BOURGARIT : Thèse, Paris, chapitre II
- 10) O. STERN & M. VOLMER : Phys. Z. 20 183 (1919)
- 11) W. R. VAUGHAM & G. WEBER : Biochemistry 9 464 (1970)
- 12) J. J. BOURGARIT : Thèse Paris Chapitre III
- 13) J. J. BOURGARIT : Thèse , Paris, chapitre IV

CONCLUSION

Un jeune auteur américain, Samuel Delany note quelque part, dans son carnet de voyage : " Endings, to be useful, must be inconclusive". Et cette dernière référence nous servira de préambule et de rappel : nous avons annoncé dans la préface comment nous comptons nous servir de cette conclusion pour souligner les lacunes, marquer le relief... en un mot dégager les perspectives. Deux questions se posent :

1°) quelles sont les points acquis, et dans quel sens conviendrait-il de prolonger ce travail ?

2°) que dire de nouveau au sujet de l'utilisation des sondes moléculaires fluorescentes en physico-chimie des macromolécules ?



Nous avons utilisé certaines des possibilités offertes par la spectroscopie électronique (qui consiste à observer les transitions électroniques des molécules, telles que l'absorption d'un photon, la luminescence...) en prenant pour support de ces investigations une molécule "banale", une sorte de standard : la Rhodamine B.

Nous avons étudié plusieurs circonstances où ces propriétés électroniques évoluent (action de la température, action des sels neutres), et observé que, dans chacune de ces circonstances l'évolution pouvait être attribuée à un déplacement d'équilibre entre plusieurs "formes" de la molécule. Nous supposons que chacune de ces formes est quand à elle indépendante, dans ses propriétés électroniques, de l'agent (température, sel) qui sert à perturber le système. Nous nous sommes ainsi singularisés : en effet la façon classique d'interpréter ces phénomènes est de supposer que la molécule se "déforme" (au sens où nous venons d'employer le mot "forme") d'une façon continue selon l'intensité de la perturbation introduite.

Revenons sur le mot "forme" : nous appelons forme d'une molécule un état de cette molécule qui peut être caractérisé par un nombre plus ou moins élevé de paramètres -spectre d'absorption, d'excitation, d'émission durée de vie et rendement quantique de fluorescence etc...

Lorsqu'une molécule possède plusieurs formes en équilibre, cela signifie qu'elle séjourne la plus grande partie de son temps dans l'un ou l'autre de ces états, et que la durée de vie des transitions entre ces états peut être tenue pour négligeable. Comme nous allons le montrer, la FREQUENCE de ces transitions est un facteur décisif pour que la mesure d'un paramètre donné permette de décider entre l'éventualité d'une déformation continue de la molécule, et l'éventualité d'un équilibre entre plusieurs formes stables :

La durée de vie d'une transition spectroscopique (absorption d'un photon) est de 10^{-15} seconde. Ce qui implique qu'un état possédant, disons, une durée de vie supérieure ou égale à 10^{-12} seconde sera très stable par rapport à cette technique de mesure. Il n'en serait pas de même si, au lieu d'un spectre d'absorption, nous observions un phénomène de diffusion rotatoire, un spectre RMN, un spectre d'émission de fluorescence : par exemple la durée de vie d'une transition de fluorescence est de 10^{-6} à 10^{-9} seconde. Il serait donc possible qu'une molécule possède deux formes distinctes au sens de la spectroscopie d'absorption UV, et qu'au sens de la spectroscopie d'émission de fluorescence elle n'en possède qu'une : il suffirait pour cela que les temps de vie des deux états de la molécule soient inférieurs à 10^{-9} s, et supérieurs à 10^{-12} s.

Voilà où réside la limite majeure de notre travail : que savons nous de la STABILITE des formes que nous avons mises en évidence ? Voici ce que nous savons sur les formes R et F de la rhodamine B : Chaque fois qu'une molécule passe de la forme F dans la forme R on enregistre un abaissement du signal de fluorescence, qui est toujours le même quelles que soient les proportions relatives de R et de F. Ce "signal de fluorescence" est une quantité complexe, qui résulte d'un prélèvement compliqué du spectre d'émission de fluorescence du mélange R-F, effectué, si lentement, par notre instrument de mesure. Cette observation nous a conduit à proposer que les formes R et F étaient également des formes stables au sens de la spectroscopie de fluorescence. Nous croyons donc savoir que ces formes ont au moins une durée de vie de 10^{-6} seconde. Nous ne sommes pas tout à fait en droit de faire cette déduction : il conviendrait de s'appuyer sur deux paramètres qui caractérisent vraiment l'existence de F et R au sens de la fluorescence :

1°) Le spectre d'émission de fluorescence (On doit pouvoir établir une loi simple -voir appendice H- entre l'évolution des intensités

de fluorescence mesurées en plusieurs points du spectre d'émission).

2*) Le déclin de fluorescence (il doit être exponentiel, ou réductible -si R est fluorescent- à la somme de deux exponentielles)

Ce sont des observations que, faute d'appareillage, nous ne sommes pas en mesure de présenter.

Imaginons néanmoins que ces contrôles, une fois effectués, confirment notre hypothèse . La durée de vie des états R et F est donc supérieure à 10^{-6} seconde : que convient il d'entreprendre pour aller plus loin ?

Il faudra, à notre avis, chercher à mesurer ces durées de vie en utilisant des techniques de relaxation (effet de "T Jump" et effet de "Stop flow"). Il nous semble prématuré de confronter nos observations à d'autres mesures expérimentales, aussi longtemps qu'on n'aura pas l'assurance de mesurer le "bon" paramètre : par exemple

- La RMN du proton est une technique qui permettra peut être d'identifier une forme indole et une forme indolénine

- La polarographie est une technique qui permettra peut être de confirmer l'existence de complexes iode-chromophore

- La RPE est une technique qui permettra peut être de montrer que, dans l'état excité, les niveaux triplets de ces complexes sont peuplés

- MAIS aucune de ces mesures ne permettra de confirmer l'existence d'un équilibre entre deux espèces, si la durée de vie de ces espèces ne s'y prête.

* * *

Nous pensons avoir répondu à la première question que nous nous sommes posé; voici ce que nous avons à dire sur la deuxième :

A partir de quelle durée de vie une forme sera t'elle "vraiment" stable ?

La question n'a de sens qu'en fonction de la réponse qu'on en attend

(par exemple : est ce que le changement de forme du tryptophane affecte la conformation de la protéine dont il fait partie ?) Dans quelles limites

est il préférable de considérer l'évolution d'une "observable" comme un processus continu (par exemple : l'évolution de la constante diélectrique

de l'eau avec la température, les transitions de l'ADN, la dénaturation des protéines) ? Ceci dépend du grossissement, dans l'échelle des espaces

ET dans celle des temps avec lequel on observe le phénomène, mais il est clair qu'il est plus économique d'avoir deux situations à étudier, plutôt qu'une infinité.

Le grossissement de la spectroscopie électronique est de niveau moléculaire (il permet d'isoler un acide aminé aromatique, une molécule de colorant) ou sub-moléculaire, si l'on se réfère à des fragments de macromolécule de taille correspondante. Dans l'échelle des temps cette méthode a la mémoire courte, c'est à dire que les corrélations avec les états antérieurs de la molécule sont presque inexistantes (quoique, dans le cas de la spectrofluorimétrie, cela puisse aller jusqu'à la durée de vie de diffusion rotatoire ou translationnelle).

Il apparait que, mieux que d'autres, et parce que le comportement des molécules complexes (colorants, mais aussi macromolécules) en solution se caractérise par un polymorphisme très évident, la technique de spectrométrie électronique est susceptible de "fragmenter" les processus de déformation. Cette technique nous fournit en effet une mesure qui (d'après nous) :

1°) est indépendante de l'environnement à longue distance (comme la température, l'état occupé par les molécules -ou fragments de molécules - voisines).

2°) est très affectée par l'environnement immédiat et la conformation locale de la molécule.

Nous avons cherché à établir les tenants et les aboutissants de cette contrainte - cela constitue en fait l'essentiel des 8 appendices- et une bonne partie de notre travail expérimental a consisté à "jongler" avec ces deux hypothèses.

Nous ne sommes pas parvenus à des certitudes. En tous cas, pas au point de pouvoir annoncer " Attention, il n'existe pas de déformations continues du spectre d'absorption... Attention, si le rendement quantique de fluorescence d'un chromophore change, c'est parce qu'il apparait dans la solution une nouvelle forme fluorescente..." Pourtant, comme on a pu le lire au chapitre V, les théoriciens de chimie quantique s'intéressent à des problèmes tout à fait similaires. Nul doute qu'un progrès fantastique serait réalisé si l'on savait opposer à ces questions simples des réponses sans ambiguïté.

Ne serait ce pas, après tout , en cherchant la réponse à de mauvaises questions?...

APPENDICES

APPENDICE A

Facteurs de conversion

1 electron volt	$1,602 \times 10^{-12}$ erf $8066,0 \text{ cm}^{-1}$ $12977,7 \text{ \AA}$ $23,08 \text{ kcal/mole}$ $11605,8 \text{ }^\circ\text{K}$
1 Angstrom	10^{-8} cm $12397,7 \text{ ev}$ 286000 kcal/mole $1,987 \times 10^{-8} \text{ erg}$ $2,8 \times 10^{18} \text{ photons}$ $2,80 \times 10^{12} \text{ photon /sec-cm}^2$ $2,86 \text{ cal/mole}$ $1,60 \times 10^{-19} \text{ ampère}$ $28,6 \text{ } \mu$
1 joule à $5560 \text{ \AA}$	
1 watt/cm ² à $5560 \text{ \AA}$	
1 cm ⁻¹	
1 electron/sec	
1 kcal/mole	
Equivalent mécanique de la chaleur	$4,186 \text{ joule/cal}$
Energie d'un quantum	$\frac{1987}{\lambda(\text{\AA})} \times 10^{-18} \text{ joule}$ $\frac{286000}{\lambda(\text{\AA})} \text{ kcal}$
Energie contenue dans un Einstein	
Equivalent mécanique de la lumière à 556nm (maximum de visibilité)	680 lumen/watt
Energie de dissociation de la liaison C-C	82 kcal/mole $3490 \text{ \AA}$ 28650 cm^{-1}
Energie de dissociation de la liaison O-H	118 kcal/mole $2420 \text{ \AA}$ 41300 cm^{-1}

APPENDICE B

L'absorption et l'émission de
radiation

L'émission et l'absorption de radiation dans un système quantifié ont été décrits par A. Einstein (Ber. Deut. phys. Ges. 18 318 (1916) ; Physik Z. 18 121 (1917)) : trois coefficients sont définis .

1) $B_{m \rightarrow n}$ est le coefficient d'absorption : il indique que le nombre N d'atomes passant par seconde de l'état m dans l'état n (dont l'énergie est plus élevée) en présence d'un champ de radiation est proportionnel au nombre N_m d'atomes présents dans l'état m , et à la densité $U(\nu)$ de la radiation absorbée,

$$N = B_{m \rightarrow n} N_m U(\nu)$$

2) $B_{n \rightarrow m}$ est le coefficient d'émission stimulée. Le nombre d'atomes passant par seconde de l'état n à l'état m en raison de l'interaction avec le champ radiatif est proportionnel au nombre N_n d'atomes présents dans l'état n ,

$$N = B_{n \rightarrow m} N_n U(\nu)$$

3) $A_{n \rightarrow m}$ est le coefficient d'émission spontanée : il exprime qu'une fraction d'atomes transite de l'état n à l'état m indépendamment de l'existence du champ de radiation :

$$N = A_{n \rightarrow m} N_n$$

La démonstration s'applique à des atomes, enfermés dans un "four" (corps noir) porté à la température T . Les coefficients A et B sont liés par une relation où cette température n'apparaît pas.

Le coefficient $B_{n \rightarrow m}$ est, dans une bonne approximation, proportionnel au carré du moment électronique moyen de la transition. Ce dernier est l'élément de matrice d'un hamiltonien (voir plus bas) qui ne fait pas intervenir l'interaction de la molécule avec son environnement (plus précisément l'environnement thermique).

Donc dans cette représentation les coefficients A et B sont Indépendants de la température, et les spectres d'absorption et d'émission non plus *.

$$B_{n \rightarrow 0} = \left(\frac{2\pi}{3h} \right) (\vec{p}_{n \rightarrow 0} \cdot \vec{p}_{n \rightarrow 0}^*)$$

$$A_{n \rightarrow 0} = \left(\frac{32\pi^3 \nu^3}{3c^3 h} \right) (\vec{p}_{n \rightarrow 0} \cdot \vec{p}_{n \rightarrow 0}^*)$$

$$P_{n \rightarrow 0} = \langle \psi_n | e \sum_j \vec{r}_j | \psi_0 \rangle \quad (**)$$

-
- * Il est possible que cette affirmation ne concerne que l'état gazeux : en l'état actuel des connaissances, elle se trouve -peut être- contredite par les travaux théoriques et expérimentaux de B. S. NEPORENT et de son école :
cf "elementary photoprocesses in molecules " Neporent ed, Consultant bureau (N. Y. 1968)

- ** sommation de l'opérateur moment dipolaire électrique sur tous les électrons de la molécule

APPENDICE C

Extinction thermique de la fluorescence s'il y a
Superposition de plusieurs mécanismes d'extinction

Soit une molécule fluorescente. Soient $k_1 \dots k_n$ les constantes de vitesse des réactions de transfert non radiatif depuis les niveaux excités $S_1 \dots S_n$ vers les niveaux S_0 ou T_1 de cette molécule. Nous supposons en outre que cette molécule se trouve en équilibre entre deux formes, dont l'une : F est fluorescente et l'autre pas.

Nous savons -appendice B- que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration $[F^*]$ des molécules présentes dans l'état excité.

Ecrivons que le régime stationnaire s'établit entre le nombre $k_a F$ de molécules gagnant les niveaux excités par seconde, et le nombre $k_r F^*$ qui le quittent dans le même temps :

$$\begin{aligned} \frac{dF^*}{dt} &= k_a F - k_r F^* - \sum_i k_i F^* = 0 \\ F^* &= \frac{k_a F}{k_r + \sum k_i} = \frac{k_a (1+K)^{-1} [C]}{k_r + \sum k_i} = \frac{k_a}{k_r} (1+K)^{-1} \left(1 + \sum \frac{k_i}{k_r}\right)^{-1} [C] \\ \frac{[C]}{F^*} \frac{k_a}{k_r} &= 1 + K + \sum \frac{k_i}{k_r} + K \sum \frac{k_i}{k_r} \end{aligned}$$

Si les coefficients d'absorption de F et C sont très voisins, pour la longueur d'onde d'excitation, alors $k_a [C]$ est le nombre de photons absorbés par seconde et l'on peut écrire :

$$\Phi^{-1} = (1+K) \left(1 + \sum \frac{k_i}{k_r}\right)$$

où Φ est le rapport du nombre de photons absorbés par seconde au nombre de photons émis par seconde, autrement dit le (pseudo) rendement quantique de fluorescence.

Premier cas On a une loi d'évolution avec la température du type :

$$\Phi^{-1} = 1 + k_0 \exp - \frac{\Delta W}{kT} \quad (k = \text{cte de Boltzmann})$$

Dans cette relation, le membre de droite contient le développement d'une constante d'équilibre, ou d'une constante cinétique, selon la loi d'Arrhénius, et nous avons donc le choix entre deux interprétations possibles :

- Si K est nul, alors toutes les constantes k_i non nulles ont la même énergie d'activation.
- Si K n'est pas nul, alors toutes les constantes k_i sont nulles.

Deuxième cas On a une loi d'évolution avec la température du type

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} \approx 1 + k_0 \exp - \frac{\Delta W}{kT}$$

Nous avons là encore le choix entre deux interprétations :

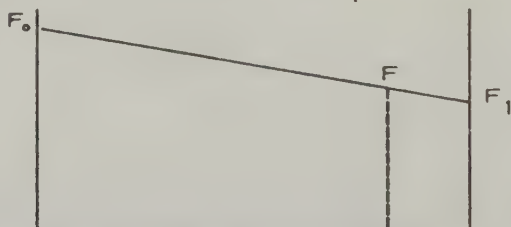
- K, ainsi qu'un certain nombre de k_i , ne varient pas avec la température, et les autres ont la même énergie d'activation.
- tous les k_i ne varient pas (ou varient très faiblement) avec la température, et l'énergie d'activation qui figure est celle de K .

APPENDICE D

Représentation paramétrique de l'extinction

Hypothèse : Nous mesurons un signal de fluorescence F , qui évolue entre deux valeurs extrêmes : F_0 et F_1 ($= \alpha F_0$) au fur et à mesure que l'agent extincteur est introduit dans la solution. Nous supposons que F est une combinaison linéaire de F_0 et F_1 , que les coefficients de cette combinaison ont pour somme l'unité, et sont entre eux dans le rapport KQ (Q = concentration de l'agent extincteur).

On observera que ces deux coefficients permettent de partager un segment de longueur unité en deux segments de longueurs inégales. Dans la figure ci-dessous on a porté, perpendiculairement aux extrémités de ces segments des grandeurs proportionnelles à F_0 , F et F_1 .



On se convaincra sans peine que les points F_0 , F et F_1 sont alignés. D'où :

$$(1) \quad KQ = \frac{F_0 - F}{F - F_1} = \frac{F_0 - F}{F - \alpha F_0}$$

$$(2) \quad \frac{QF}{F_0 - F} = \alpha \frac{QF_0}{F_0 - F} + K^{-1}$$

On peut également écrire à partir de (1)

$$(3) \quad \frac{QF}{F_0 - F} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} Q + \frac{1}{K(1 - \alpha)}$$

On a pu, dans les deux équations qui sont encadrées, séparer les paramètres mesurables des paramètres inconnus, de telle sorte que ces derniers puissent être mis en évidence par régression linéaire.

APPENDICE E

Relation entre les mesures de température et les mesures de différence de densité optique, pour une solution contenant deux formes échangeables d'un même chromophore - Loi d'Arrhénius-stoechiométrie 1:1

Enoncé

Soit l'équilibre $F \rightleftharpoons I$, et $K(T)$ la constante de cet équilibre.
 Soit $Y(T)$ la différence de densité optique, mesurée à une longueur d'onde donnée, entre deux échantillons du même chromophore, où l'un est à la température T_0 et l'autre à la température T .
 Soit T_e une température choisie arbitrairement.
 Soit $Z(T)$ l'expression ;
$$Z(T) = \exp T_e (T_0^{-1} - T^{-1})$$

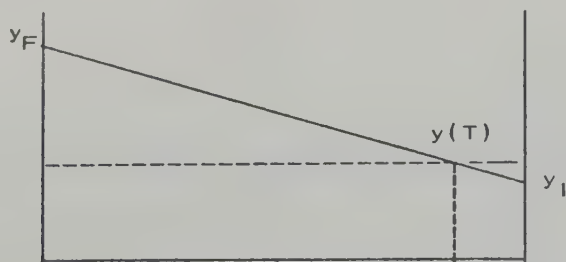
Nous allons démontrer qu'il existe entre les fonctions $f(T) = YZ/(1-Z)$
 et $g(T) = Y/(1-Z)$

une relation telle que la représentation de f en fonction de g ne sera une droite que dans la mesure où T_e représente la différence d'enthalpie entre I et F (autrement dit $K(T) = k_0 \exp - T_e/T$).

Trop faible, T_e conduira à une courbe à la concavité tournée vers le bas ;
 trop fort, ce sera une courbe à la concavité tournée vers le haut.

Démonstration

La densité optique de l'échantillon à la température T est une combinaison linéaire de deux densités : y_F et y_I . Les coefficients de cette combinaison sont entre eux dans le rapport $K(T)$; ils ont pour somme l'unité, et partagent un segment de longueur unité en deux segments inégaux : segments qui sont représentés dans la figure ci-dessous surmonté de grandeurs proportionnelles à y_F , y et y_I .



Les quantités qui ont été définies plus haut s'écriront :

$$(1) \quad K(T) = k_0 \exp - T_e/T = \frac{y_F - y}{y - y_I}$$

$$(2) \quad Y(T) = y(T) - y(T_0)$$

$$(3) \quad Z = \exp -T_e (T^{-1} - T_0^{-1}) = \frac{K(T)}{K(T_0)}$$

$$(4) \quad y(T) = (y_F - y_I) \left[\frac{1}{1+K(T)} - \frac{1}{1+K(T_0)} \right]$$

posons $K_0 = K(T_0)$: le terme entre crochets s'écrit
$$\frac{K_0(1-Z)}{(1+ZK_0)(1+K_0)}$$

Et nous obtenons la relation cherchée, où l'on reconnaîtra f et g :

$$(5) \quad \frac{Y}{1-Z} = -K_0 \frac{YZ}{1-Z} + \frac{K_0(y_F - y_I)}{1+K_0}$$

La relation (5) constitue donc une méthode permettant d'obtenir, par approximation successive, l'expression de K en fonction de T. Dans les cas où cette méthode a été appliquée à des mesures de différences de densité optique, il nous a paru qu'elle permettait d'obtenir l'enthalpie de l'équilibre à $\pm 0,2$ kcal. Ce test a été également appliqué à des mesures de différences d'intensité de fluorescence : la précision est de $\pm 0,5$ kcal/mole.

Il s'agit dans les deux cas d'une appréciation visuelle, entre des séries de représentations pour lesquelles Z a été calculé pour des valeurs de ΔH échelonnées de 0,1 kcal en 0,1 kcal.

Nous avons également étudié par simulation l'évolution de la représentation paramétrique (f, g) : on observe que cette représentation s'écarte le plus significativement de la linéarité pour les valeurs de Z avoisinant l'unité.

EFFETS DE FILTRE INTERNE

Voici, sans trop de commentaires, trois sources d'erreur :

*** La première : Certaines des représentations que nous avons utilisées ne conviennent que si l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration. Ce qui n'est en fait jamais "vrai" puisque la quantité de lumière absorbée par une solution, diluée ou non, varie comme " $1 - 10^{-\epsilon C l}$ " où ϵ est le coefficient d'extinction, et C la concentration.

*** La seconde : Soit un mélange ternaire : solvant + soluté 1 + soluté 2. Supposons que 1 et 2 ont le même coefficient d'extinction (pour simplifier), et des concentrations C_1 et C_2 . Il est clair que le nombre de photons absorbés par 1 et 2 sont entre eux comme les nombres C_1 et C_2 . Supposons que ce nombre total de photons approche de la totalité des photons disponibles : Alors, du fait de l'introduction de l'espèce 2, l'intensité absorbée par 1 n'est pas I_0 , mais $I_0 (C_1 / (C_1 + C_2))$.

Le cas doit donc se présenter où ce déficit dans la quantité de photons absorbé se traduira par un déficit dans le signal de fluorescence de 1 :

$$F_0 / F = 1 + C_2 / C_1 \quad \text{où } F \text{ est le signal produit par l'espèce 1.}$$

Posons $C_2 = Q$, et supposons que l'espèce 2 n'est pas fluorescente : Il vient

$$\frac{F_0 - F}{F} = Cte \cdot Q$$

L'introduction d'une substance étrangère absorbante et non fluorescente crée donc, à trop forte densité optique, un effet analogue à celui du quenching.

*** La troisième : Nous pourrions appeler cet effet, le plus insidieux :

filtrage du bruit de fond

1°) Il est d'usage en spectrophotofluorimétrie de soustraire le signal émanant du solvant et de la verrerie (signal de zéro). Cette soustraction se fait le plus souvent électroniquement, de sorte que l'on ne connaît pas toujours la vraie valeur de ce signal de zéro, ou "bruit de fond". Ce dernier provient évidemment de l'interaction (récepteur, solvant) & (lumière d'excitation). Pourtant lorsqu'on ajoute, dans un deuxième temps, le soluté fluorescent, celui-ci interagit également avec cette lumière : donc les photons utilisés "pour faire du bruit" tendent à être mobilisés "pour faire du signal".

En d'autres termes le signal de bruit pour lequel l'instrument est automatiquement corrigé est toujours trop élevé.

2°) Attention à l'effet antagoniste, en spectrométrie UV différentielle !...

APPENDICE G

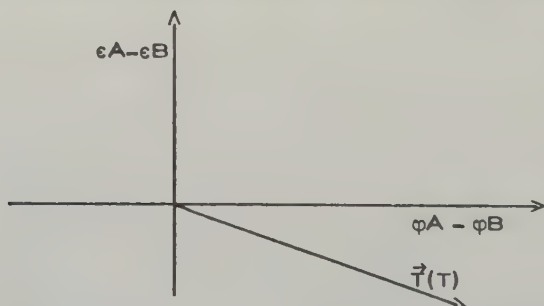
Corrélation entre absorption et intensité d'émission :Cas où la fluorescence ne dépend pas de la température

Nous désirons savoir comment se présente un diagramme dont les points représentatifs ont respectivement pour abscisses et pour ordonnées les intensités de fluorescence (ou les rendements quantiques de fluorescence) et les coefficients d'extinction, mesurés à la même température pour un même point, et aux mêmes longueurs d'ondes, pour tous les points.

L'hypothèse de départ est que les coefficients d'extinction évoluent uniquement par suite du déplacement d'un équilibre 1:1 entre une forme fluorescente A, et une autre : B.

Autrement dit : chaque fois qu'une molécule A disparaît, une molécule B apparaît.

Solt le vecteur $\vec{T}$ défini comme suit : On imagine que, à la température T, on sait mesurer l'intensité de fluorescence émise par une molécule sous la forme A, par une molécule sous la forme B, ainsi que le coefficient d'extinction moléculaires de A et B. Dans notre diagramme, le vecteur T est le vecteur qui joint les deux points -A- et -B- ainsi définis.

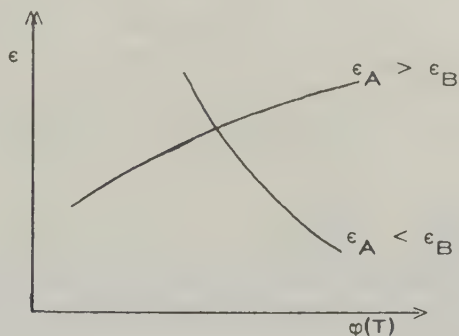


Il est clair que tout déplacement infinitésimal, correspondant à une modification de composition du mélange A-B, se traduit dans le diagramme par une progression qui se fait dans la direction définie par $\vec{T}$. Mais ce déplacement s'obtient, par hypothèse, en changeant la température. Donc deux cas se présentent :

a) Si les propriétés lumineuses des espèces A et B (forme des spectres d'excitation et d'émission, rendement quantique) n'évoluent pas avec la température, le vecteur $\vec{T}$ est constant, donc le diagramme est une droite.

b) Dans le cas contraire, tout peut se produire. Pourtant nous pensons que l'effet le plus sensible sera la diminution du rendement quantique avec la température : supposons que B est à la fois l'espèce la moins fluorescente, et celle dont la concentration croît lorsque la température augmente

on voit que la pente (en valeur absolue) du vecteur T augmente lorsque les abscisses des points représentatifs diminuent, et cela nous conduit à des représentations du type suivant :



c) Nous pouvons enfin nous trouver dans le cas où A et B fournissent à chaque instant le même signal de fluorescence, et où ce signal décroît avec la température. C'est le cas où toute l'extinction est de type cinétique. Le diagramme continuera à être linéaire si, par extraordinaire, la constante de l'équilibre A-B et la constante cinétique d'extinction sont, en toutes températures, identiques (et il y aura lieu, alors, de s'inquiéter de cette coïncidence).

APPENDICE H

Corrélation entre les mesures de coefficient d'absorption faites
en divers points du spectre d'absorption dans le cas où il y a deux
formes colorées

Nous désirons établir le fait -trivial- que si deux chromophores s'échangent dans une solution de telle sorte que la quantité totale (par exemple : le poids) de chromophore reste constant, on doit observer des corrélations significatives en faisant des mesures sur le spectre d'absorption.

Soient deux espèces A et B possédant respectivement des coefficients d'absorption $\epsilon_A(\lambda)$ et $\epsilon_B(\lambda)$ (définis pour toutes les longueurs d'onde λ), et soit C le mélange de ces deux espèces dans les proportions x et 1-x :

Le coefficient d'extinction de C est (dans la mesure où A et B ne sont pas perturbés par la présence de B et A

$$\epsilon_C(\lambda) = x \epsilon_A(\lambda) + (1-x) \epsilon_B(\lambda)$$

Donnons à λ deux valeurs quelconques : λ_1 et λ_2 , et éliminons x entre les deux relations que l'on obtient ainsi.

$$\epsilon_{\lambda_1} \left[\epsilon_A(\lambda_2) - \epsilon_B(\lambda_2) \right] - \epsilon_{\lambda_2} \left[\epsilon_A(\lambda_1) - \epsilon_B(\lambda_2) \right] = \\ \epsilon_B(\lambda_1) \left[\epsilon_A(\lambda_1) - \epsilon_B(\lambda_2) \right] - \epsilon_B(\lambda_2) \left[\epsilon_A(\lambda_1) - \epsilon_B(\lambda_2) \right]$$

Nous obtenons une relation linéaire entre les coefficients d'absorption. Il est clair que nous aurions obtenu le même résultat en prenant n'importe quel signal dont l'amplitude soit égale à la somme des contributions de A et de B - en particulier la hauteur du spectre d'absorption, sans tenir compte de la résolution des mesures.

On doit donc obtenir une droite en portant la variation d'extinction à une longueur d'onde en fonction de la variation d'extinction à une autre longueur d'onde, si ces deux variations sont dues à l'évolution de la composition d'un mélange binaire.

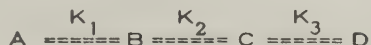
Aucune théorie ne permet de penser que cela devra être le cas si le spectre d'absorption évolue pour une autre raison.

La contrainte que nous venons d'énoncer est plus forte que la contrainte : présence de points isobestiques. Elle est aussi plus générale.

APPENDICE I

Les espèces virtuelles

Supposons que quatre espèces : A, B, C et D soient en équilibre selon le schéma ci-dessous :



Supposons que, sous l'action d'un agent extérieur (par exemple la concentration d'un sel dans la solution ...); la constante K_2 varie, cependant que K_1 et K_3 ne varient pas.

Nous dirons alors que tout se passe comme si le couple (A-B) formait une seule espèce X, le couple (C-D) une autre espèce Y, avec :

$$(2) |X| = |A| + |B| \qquad (24) |Y| = |C| + |D|$$

$$(3) \quad X \xrightleftharpoons{K'_2} Y$$

$$(4) \qquad K'_2 = K_2 \frac{1 + K_3}{1 + K_1^{-1}}$$

Les espèces X et Y, quoique virtuelles, ont une existence au sens où l'on peut mesurer le "spectre d'absorption" de X, le "rendement quantique de fluorescence" de Y, ou de toute autre variable intensive ou extensive dont la valeur grandit linéairement avec $|A|$, $|B|$, etc... X et Y peuvent être traitées comme de véritables molécules aussi longtemps que K_1 et K_3 restent invariants... Ce qui ne se produit généralement pas lorsqu'on agit sur la température : K'_2 n'obéit vraisemblablement pas à la loi d'Arrhénius.

APPENDICE J

Commentaire sur une loi d'évolution de type sigmoïdal

Nous observons dans la figure 3 du chapitre II que l'évolution du coefficient d'extinction en fonction de la température suit une courbe de type sigmoïdal dans le cas où cette évolution correspond au déplacement d'un équilibre 1:1 entre deux espèces.

La constante $K(T)$ de cet équilibre est caractérisée par deux paramètres : k_0 et ΔW , qui permettent d'écrire la relation d'Arrhénius :

$$K = k_0 \exp \left(- \Delta W / kT \right) \quad (k = \text{cte de Boltzman})$$

et cette relation reste vraie aussi longtemps que ΔW ne dépend pas de T

Nous désirons étudier ici comment cette courbe sigmoïdale dépend de ces deux paramètres : c'est à dire que nous nous intéresserons à l'abscisse et à la pente de la courbe au niveau de son pseudo-centre de symétrie. Nous étudierons pour cela une relation de type similaire : il s'agit de la relation empirique qui lie la décroissance du rendement quantique de fluorescence à la température :

$$\Phi^{-1} - 1 = k_0 \exp - \frac{\Delta W}{kT}$$

En effet la décroissance de Φ en fonction de T est de type sigmoïdal, et la représentation est celle de la figure 3 à ceci près que l'ordonnée à l'origine est 1, et l'ordonnée de l'asymptote est zéro.

Soit T_m la température pour laquelle Φ vaut 1/2 : on trouve alors :

$$k_0 = \exp \frac{\Delta W}{kT_m}$$

$$\Phi' = - 4 \frac{\Delta W}{kT_m^2} \quad (\text{pente de la courbe})$$

Voici ce que ces relations nous enseignent :

1°) Dans la mesure où l'on compare des phénomènes qui se produisent à la même température (et dans notre manuscrit, il s'agit de la température ordinaire), c'est la deuxième relation qui présente le plus d'intérêt : Elle nous montre que l'évolution du phénomène en fonction de la température sera d'autant plus "raide" que ΔW est grand.

2°) Au contraire, si les phénomènes que l'on compare se caractérisent par des ΔW semblables (ainsi la loi d'extinction de la fluorescence, dans l'eau, semble correspondre à des ΔW de 6 à 8 kcal/mole) la décroissance se place à des températures d'autant plus élevées que k_0 est petit.

Ainsi que nous allons le montrer, cette dernière observation n'est peut être pas sans intérêt, car k_0 est un paramètre qui a une signification physique, et qui est peut être borné supérieurement.

Prenons par exemple une molécule dont la durée de vie de transition radiative est 10^{-8} seconde. Dans l'expression que nous avons utilisée pour ϕ , le paramètre k_0 représente, pour autant que l'extinction soit de type cinétique, le produit d'un paramètre "facteur de fréquence" par la durée de vie de transition radiative.

Il n'est pas courant que les facteurs de fréquence dépassent la valeur 10^{12} : ainsi k_0 ne devrait guère dépasser la valeur $10^{12}/10^8 = 10^4$. Prenons pour énergie d'activation une valeur moyenne : $\Delta W = 7$ kcal/mole, et appliquons la relation ci-dessus :

$$\text{Nous trouvons } T_m \geq \frac{3500}{9} = 390^\circ\text{K}$$

Autrement dit l'extinction d'une molécule fluorescente à courte durée de vie devrait, s'il s'agit d'un phénomène cinétique, intervenir bien au dessus de l'ambiante.

APPENDICE K

Confection de références stables pour les mesures de fluorescence

Le principe retenu pour la confection de références stables est celui de l'inclusion dans des matrices transparentes solides. Nous avons utilisé pour cela un produit polymérisable, vendu dans le commerce sous le nom de résine polyester (il y a plusieurs marques), et utilisé pour l'inclusion de petits objets (papillons, pièces de monnaie etc...) à des fins décoratives. La polymérisation conduit à un solide vitreux, incolore, mais opaque à l'ultra-violet (cut Off : 400 nm), si bien que nous n'avons pas cherché à inclure des chromophores dont le spectre d'excitation se situe dans l'UV (tels que le tryptophane), mais seulement des colorants.

Nous avons employé un procédé d'inclusion très proche de la méthode usuelle : la première étape consiste à dissoudre le colorant dans le liquide non polymérisé (ce qui n'est pas toujours possible : ainsi pour étudier l'uranine et la fluorescéine nous avons employé un produit fluorescent ayant un spectre d'excitation et d'émission voisin : l'auramine). Il peut être bon de chauffer jusqu'à obtenir un liquide très fluide (80°C). On peut dissoudre d'abord le colorant dans le chloroforme (mais jamais dans l'eau). Après brassage du liquide on introduit le catalyseur, en respectant les proportions conseillées par le fabricant. On brasse à nouveau, brièvement, avant de verser le liquide dans un moule (nous avons utilisé le plus souvent un moule en verre, et plus précisément les tubes utilisés pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide). L'ensemble est immédiatement porté à la chambre froide, et centrifugé pendant 10 minutes à 1500g pour évacuer les bulles. On laisse le moule dans le froid pendant une heure environ, ce qui retarde la polymérisation, puis on le porte dans une étuve à 50°C, où le durcissement est effectif après deux heures.

Le démoulage s'opère en refroidissant le tout à -20°C (Si la matière n'a pas été convenablement brassée, elle se fragmente lors de cette dernière opération)

Le spectre d'émission de l'inclusion de Rhodamine B présente un maximum à 600nm. Il ne s'agit apparemment pas d'une émission de phosphorescence.

La dilatation thermique de la résine ne nous est pas connue, mais elle semble beaucoup plus importante que celle du verre, et on pourra avoir à en tenir compte.

INDEX DES NOMS D'AUTEURS

INDEX DES AUTEURS

A

Alentsev M. N.	18
Aristov A. V.	17, 19, III
Arrio B.	VI4, VIII1
Arvan K.	17
Asker	14
Ayers I.	14

B

Babko A. K.	19, III1
Baeyer	12
Bakshiev N. P.	17, III4
Balazs E. A.	16
Barenboin G. M.	VI4
Benson S. W.	V2
Bernthsen	12
Birks J. B.	IV4, V1
Bobrovitch	VI4
Bowen E. J.	V1
Bradley R. A.	VIII1
Braun G.	18
Bridges J. W.	VI3
Brown W. R.	14
Buettner A. V.	18
Burkland R. K.	11
Burshtein E. A.	VI4, VIII1

C

Caragay A. B.	15
Chernitskii E. A.	VI4
Chibisov A. K.	18, II7
Chmutina L. A.	VIII2
Czys	18

D

Delany S.	C1
DeLauder W. B.	VI3
Djerassi C.	II6
Dziewonski K.	13, II2

E

Edelman G. M.	11, VI1, VI4, VII1
Einstein A.	A2
Eisinger J.	VI1
Enrich H. M.	16
Epstein L. F.	16, II2

F

Feitelson J.	VII1
Feldman I.	VI3
Feofilov P. P.	18, II7
Ferguson J.	II2, II8
Fischer S. F.	11, V1
Fletcher A. N.	V6
Fôrster T.	19, IV3
Foss J. G.	VI4
Frank J. M.	19, III1, IV2
Frank Kamenetski	17

G

Galley	VI4
Gally J. A.	VI1, VI4, VII1
Gelewitz	11
Giachino G.	IV3
Glazkov Yu. V.	16
Glowacki J.	18, 19, III1, IV3, IV10
Gofman I. A.	II9
Gotoh R.	16
Greenbaum J.	III4, IV9
Guilbault M. M.	VI
Guire R. M.	VI3
Gunthard H.	14
Gutsze	15, II2

H

Hameka H. F.	V1
Hayon E.	VII1
Heckmans M. A.	110
Heinz E.	18
Hill M.	VI4
Hevesi J.	19, II0, III1, III1
Henry B. B.	V1
Holmes W. C.	16, IV2
Horobin M. W.	110
Huber J. R.	14

I

Imai Hiroma	18
Ioffe I. S.	12, II2, II9
Ismail	14

J

Jablonski A.	19, III1, IV2
--------------	---------------

Jukova M. N. VI4
 Jung M. L. 15, II2
 Junge W. 16

K

Karger B. L. 15
 Karrer P. 13
 Kasha M. 19, V1
 Kawski A. 18
 Kearns D. R. IV3
 Kegel 18, II7
 Ketskemety J. 110
 Kinoshita M. IV3, V1
 Klotz 11
 Konev S. V. VI4
 Korsunovskii G. A. 17
 Kostyshima A. P. 19, III1
 Kozma L. 17, II0, III1
 Kruglik E. K. 16
 Kurbatov B. L. 110

L

Laffitte E. 17
 Laikin M. 112
 Land E. J. 19
 Lange E. IV4
 Laurence D. J. R. 11
 Lavorel J. III1
 Lee S. B. 15
 Le Guin U. P1
 Lehrer S. VIII1
 Levshin L. V. 16, 17, 18, 117
 Lucatu E. 19, III1, III3

M

Mc Elry 111
 Mc Glynn S. P. IV3, V1
 Mc Lure 11
 Marinesco M. S. 15
 Mason F. A. 14
 Matsumoto M. 16
 Mazurenko Yu. T. 17, III4
 Meyer R. 12
 Morozov Yu. V. 17
 Moskowitz S. P. IV3, V1
 Murgatroyd L. B. 110

N

Nau A. W. H. 112
 Navon G. VI1

Neporent B. S. 17, III4, A3
 Nizonov N. 17
 Noeltig 13, II2
 Nouchi G. 17

P

Parker C. A. V1
 Parquet VI4
 Penova I. V. 16
 Perlman G. E. VI4
 Permogorov V. I. 17
 Peterson O. G. 18
 Phillips G. O. 16
 Piutti 12
 Platt J. R. 17
 Podberezskaya 19, III1
 Polacka B. 18
 Polyakov S. 19
 Prakash S. 16
 Pringsheim P. 17, 111
 Prütz W. 19, IV9
 Purkey VI4

R

Rabinowitch E. 16, 112
 Ramakrishnan V. IV3
 Ramette R. W. 112
 Ray F. E. 15, 112
 Remers A. W. VI3
 Rischer S. F. 11
 Rocher F. VIII1
 Rohatgi K. K. 16, 112
 Roitman O. P. VII2

S

Sachse U. 12
 Sandell E. B. 112
 Savost'yanova M. V. 15
 Schlag E. W. 11, V1
 Schelly Z. A. 110
 Schneider S. 11, V1
 Schonber 14
 Seliger H. H. 111
 Selwyn J. 112
 Serdyukova L. A. 17
 Shapiro A. L. 112
 Shilenkov E. A. 19, III1
 Sill G. W. 17, 115
 Singhal G. S. 16, 112
 Singleterry C. R. 16
 Slavnova, T. D. 16, 18, 117

Snaveley B. B.	18		
Sommermeyer K.	19, IV9		Y
Speas W. E.	16, III1		
Steiner R. F.	VI3, VIII1	Ygyerabide	16
Steinfeld J.	II2	Young M. D.	16
Stern O.	IV2VIII4		
Stryer L.	11		Z
Sundmacher W.	12		
Sunseri R.	IV3	Zal'manovich M. Z.	119
Sushkova V. A.	19, III1	Zotov N. I.	16
Sveshnikov B. Ya.	18, II7		
Szalay L.	17, III0, III1		

T

Tamai H.	16
Tarasova T. M.	119
Teale F. W.	18, III1, VIII1
Tombacz	111

U

Urquhart J. M.	11
----------------	----

V

Vaughan W. R.	VIII5
Vavilov S. J.	19, III1, IV2
Vedenkina E. S.	VI4
Verma S. P.	16
Vernotte C.	VIII1
Viktorova E. N.	17, III1
Vilesov F. J.	110
Volmer M.	IV2, VIII4

W

Wahl H.	13
Wahl P.	VI3
Walerys I.	15, II2
Watanabe A.	16
Wawzonek S.	13
Weber G.	11, 18, III1, III1, VI4, VIII5
Weber J.	110
Weiberg L. A.	16
Weiryb I.	VI3, VII1
Wellman K. II6	116
Wild	14
Williams M. T.	VI3
Winkler M. H.	
Witt H. T.	16
Wize	111
Woislowski S.	15, II2
Wong M. M.	110

REMERCIEMENTS

On ne prête qu'aux riches ...

Voici donc que je voudrais célébrer les autres :

- Ceux qui ont contribué anonymement à ce travail : Claude Soulié, Liliane Corne, Annick Larousse, Begnina Roo-Sonora.
- Ceux de l'INSTITUT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE, où s'est déroulé e la plus grande partie de l'expérimentation, et en particulier Madame Anne Brunello, au service de documentation, Madame Odette Champion, au service de reproduction photographique, Monsieur Jean Claude Deschepper, au service de mécanique d'instrumentation.
- Et ceux enfin qui ont suivi - et souvent précédé - la démarche scientifique de l'auteur sur tout ou partie des six années qu'a duré ce travail. (Dr R. Van Rapenbusch, Dr. F. Garnier, Dr. J. Brahms, Dr. M. Schott)

Entre le mois de septembre 1968, où s'ébauche ce projet de travail, et le mois de décembre 1974, où la première publication de cette thèse s'achève, notre famille s'est agrandie de quatre enfants : ANNE, DAVID, MATHIEU et GILLES. Nous avons perdu, leur mère et moi, un frère : Denis Rousse-Lacordaire, et un ami cher : Jean Perrin-Jacquet. C'est la mémoire de tous ces vivants et de tous ces morts que nous voudrions, si cela peut être, honorer ici.

